

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Estudio de algunos fenómenos xenogénicos entre cáncer
mamario humano y murino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Herminia Valladares Álvarez

Directores

Isidro Valladares Sánchez
Ismael Álvarez Rodríguez

Madrid, 2002

ISBN: 978-84-669-0005-8

© Herminia Valladares Álvarez, 1993

ESTUDIO DE ALGUNOS

FENOMENOS XENOGENICOS ENTRE

CANCER MAMARIO HUMANO Y MURINO

POR

HERMINIA VALLADARES ALVAREZ

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

AÑO 1993

**Atención Especializada.
Area 7. MADRID**

HOSPITAL UNIVERSITARIO

CALLE CADIZ

MADRID 28002

TEL. (91) 330 30 00

(91) 330 30 01

TEL. (91) 330 30 00

(91) 330 30 01



DOMINGO ESPINOS PEREZ, CATEDRATICO DE PATOLOGIA Y CLINICA
MEDICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID.

Como Tutor de la Tesis Doctoral presentada por D^a HERMINIA VALLA
DARES ALVAREZ,

C E R T I F I C A : Que dicho trabajo de investigación ha sido -
realizado en el Departamento de Biología y
Bioquímica del Cáncer de la Unidad Oncológica
del Hospital Universitario San Carlos, ba
jo la dirección del Prof. Ysidro Valladares
Sánchez y el Dr. Ysmael Alvarez Rodriguez.

Para que conste, firmo el presen
te Certificado en Madrid a dos de julio de
mil novecientos noventa y tres.

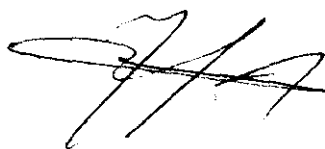
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA Y BIOQUIMICA DEL CANCER (ICAM)
HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CARLOS
CIUDAD UNIVERSITARIA
APARTADO 80.004
28040 MADRID - ESPAÑA

Ysmael Alvarez Rodríguez, jefe del Departamento de Biología y Bioquímica del Cáncer, de la Unidad Oncológica del Hospital Universitario San Carlos,

CERTIFICA:

Que Doña Herminia Valladares Alvarez, licenciada en medicina, ha realizado en este departamento el trabajo titulado "Estudio de algunos fenómenos xenogénicos entre cáncer mamario humano y murino", que presentará para acceder al grado de doctor.

Y para que conste, firma la presente certificación en Madrid, a uno de julio de mil novecientos noventa y tres



Fdo.: Dr. Ysmael Alvarez Rodriguez

DEDICATORIA

A JAVIER, POR SU GRAN APOYO Y EMPUJE,

Y A NUESTRA FUTURA DESCENDENCIA.

Y A MIS PADRES.

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecida a todas las personas que tanto me han ayudado en la elaboración y terminación de esta tesis.

Al Prof. Ysidro Valladares Sánchez y al Dr. Ysmael Alvarez Rodríguez, mis directores de tesis, por su imprescindible aporte en los campos científico y técnico, además del aporte afectivo.

Al Prof. Domingo Espinós Pérez, que reúne inteligencia y simpatía, por aceptar ser mi tutor.

A la Dra. Granada Alvarez Noves, por haberme enseñado y ayudado en la tarea diaria, con esa gracia y humor que le caracteriza.

A los incansables Rocío Alvarez Rodríguez y Miguel Angel Valladares Alvarez, por el trabajo que supuso la transcripción del texto y la elaboración de las gráficas y tablas del trabajo, realizados desinteresadamente y con cariño, en un tiempo récord impuesto por diversas circunstancias.

A todas las compañeras que me han ayudado tanto en la realización de las técnicas utilizadas durante mi estancia en el Departamento de Biología y Bioquímica del Cáncer, la Dra. Margarita del Pozo Méndez y las Srtas. Elena Algarra López y Aurora Muñoz Jiménez, y en la preparación del material empleado

para las mismas, Srtas. Concepción Cerro Rodríguez y Margarita Bardera Martín.

Y a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, han estado conmigo durante estos años.

INDICE

	Página
PROLOGO	14
I. OBJETIVOS DEL PRESENTE	
TRABAJO	16
II. REVISION DEL PROBLEMA DEL	
CANCER DE MAMA	20
II.A. <i>Desarrollo embriológico e histogénesis</i>	
<i>de la mama</i>	20
II.B. <i>Estructura histológica de la mama en reposo .</i>	22
II.C. <i>Cambios mamarios durante el embarazo</i>	23
II.CH. <i>Cambios mamarios durante el periodo de</i>	
<i>lactancia</i>	24
II.D. <i>Clasificación histológica del cáncer</i>	
<i>mamario</i>	25
II.E. <i>Clasificación clínica del cáncer mamario</i>	33
II.F. <i>Etiopatogenia del cáncer mamario</i>	36
II.F.1. Factores generales	36
II.F.2. Virología del cáncer mamario	44
II.F.2.a. <i>Murino</i>	44
II.F.2.b. <i>Humano</i>	45
II.G. <i>Inmunología del cáncer de mama</i>	50
II.G.1. Inmunología del cáncer mamario murino ...	50
II.G.2. Inmunología del cáncer mamario humano ...	60

III. MATERIAL Y METODOS	84
III.A. <i>Mujeres</i>	84
III.B. <i>Animales</i>	84
III.B.1. <i>Ratones Swiss</i>	84
III.B.2. <i>Cepa ínsita de ratones C3H/he</i>	85
III.B.3. <i>Conejos</i>	86
III.C. <i>Cultivos de células "in vitro"</i>	86
III.C.1. <i>Técnica del cultivo primario</i>	87
III.C.2. <i>Técnica del subcultivo de líneas</i> <i>celulares establecidas "in vitro"</i>	88
III.C.2.a. <i>Línea celular MMT establecida</i> <i>"in vitro"</i>	90
III.C.3. <i>Técnicas de viabilidad y recuento</i> <i>celular</i>	92
III.C.4. <i>Curva de crecimiento de las</i> <i>poblaciones celulares</i>	95
III.C.5. <i>Eficiencia de planqueo</i>	97
III.CH. <i>Medios de cultivo para pruebas de</i> <i>esterilidad bacteriana, micológica y</i> <i>micoplásmica</i>	98
III.D. <i>Técnicas de congelación y descongelación</i> ...	101
III.E. <i>Obtención de linfocitos para su cultivo</i> <i>"in vitro"</i>	103
III.E.1. <i>Linfocitos humanos de sangre</i> <i>periférica</i>	103

III.E.2. Linfocitos de sangre periférica de ratón	103
III.F. <i>Soluciones y medios nutritivos utilizados para el cultivo de células "in vitro"</i>	104
III.G. <i>Medios nutritivos para el cultivo de células "in vitro"</i>	111
III.G.1. Medio esencial mínimo (MEM) de Eagle ...	111
III.G.2. Medio R5a de McCoy	111
III.G.3. Medio R5a-I (medio R5a de McCoy modificado por Iwakata)	115
III.H. <i>Técnicas de fijación y tinción citológica</i> .	115
III.H.1. Células cultivadas "in vitro"	115
III.H.2. Fijadores	116
III.H.3. Métodos de tinción	116
III.H.3.a. Tinción con hematoxilina y eosina	116
III.H.3.b. Tinción con Giemsa	118
III.H.3.c. Tinción de May-Grünwald-Giemsa ...	119
c.1. Solución de May-Grünwald	119
III.I. <i>Técnica de la cinefotomicrografía de intervalos en contraste de fases</i>	119
III.I.1. Equipo utilizado y condiciones de filmación	120
III.I.2. Protocolo de registro de datos de filmación	122
III.I.3. Análisis de las películas	124

III.J. <i>Técnicas para microscopio electrónico</i>	124
III.J.1. Procedimiento para cultivo de células	
"in vitro"	124
III.J.1.a. Fijación	124
III.J.1.b. Deshidratación e inclusión	126
III.J.1.c. Preparación de cortes ultrafinos ..	126
III.J.1.ch. Tinción de los cortes	127
III.J.2. Soluciones y reactivos empleados	127
III.K. <i>Aislamiento de inmunoglobulinas</i>	130
III.K.1. Aislamiento de inmunoglobulinas	
circulantes	130
III.K.1.a. Aislamiento de inmunoglobulinas	
por precipitación con sulfato	
de amonio	130
a.1. Soluciones a utilizar	132
III.K.1.b. Aislamiento de inmunoglobulinas	
por cromatografía de filtración	
en reciclo ascendente	133
b.1. Buffer empleado	136
III.K.2. Aislamiento de inmunoglobulinas	
humanas unidas a membranas de	
células MMT	138
III.K.3. Aislamiento de inmunoglobulinas	
mediante tratamiento ácido de	
células	140
III.K.3.a. Buffer empleado	141

III.K.4. Aislamiento de inmunoglobulinas de vesículas zeioticas de células MMT ...	141
III.L. Reconocimiento de inmunoglobulinas	143
III.L.1. Espectrofotometría y técnica de la inmunodifusión de Ouchterlony	143
III.L.1.a. Solución empleada	144
III.L.2. Técnica de la inmunofluorescencia	144
III.L.2.a. Buffer empleado	145
III.LL. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	145
III.LL.1. Soluciones y reactivos empleados	146
III.LL.2. Preparación del conjugado proteína A-fosfatasa	150
III.LL.3. Fijación a los antígenos de la placa .	151
III.LL.4. Verificación de la reacción	151
III.M. Obtención de fracciones subcelulares	153
III.M.1. Aislamiento de la membrana plasmática en gradiente discontinuo de densidad en sacarosa	153
III.M.2. Aislamiento y purificación de virus (MMTV) de tumores mamarios murinos	159
III.M.2.a. Aislamiento del MMTV	159
III.M.2.b. Purificación del virus mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	160
III.M.2.c. Soluciones empleadas	162
III.N. Técnicas inmunológicas	163

III.N.1. Inmunización de conejos con membrana plasmática purificada de células humanas o de ratón	163
III.N.2. Inmunización de conejos con antígenos víricos	164
III.N.3. Inmunización de conejos con inmunoglobulinas humanas y de ratón ...	165
III.N.4. Inmunización de ratones	166
III.N.5. Pruebas de titulación de los inmunosueros	166
III.N.5.a. Prueba del anillo	166
III.N.5.b. Prueba de las relaciones óptimas .	166
III.N.5.c. Inmunodifusión	168
III.N.5.ch. Titulación de la serotoxicidad ..	170
III.N.5.d. Prueba de inhibición de la serotoxicidad	171
III.N.5.e. Titulación de la citotoxicidad por el método de Takasugi y Klein	172
III.Ñ. Valoraciones bioquímicas	174
III.Ñ.1. Valoración de proteínas por el método de Lowry	174
III.Ñ.1.a. Soluciones empleadas	174
III.Ñ.1.b. Elaboración de la curva patrón	175
III.Ñ.2. Determinaciones por métodos espectrofotométricos	176
III.Ñ.2.a. Determinación de proteínas,	

inmunoglobulinas y nucleoproteínas.	176
IV. RESULTADOS	178
IV.A. <i>Efecto del suero sanguíneo de mujeres</i> <i>sanas y con carcinoma mamario sobre las</i> <i>células MMT</i>	178
IV.A.1. Sueros tóxicos y no tóxicos	178
IV.A.2. Observaciones morfodinámicas de la degeneración celular	180
IV.A.3. Reacción de inmunofluorescencia entre células MMT e inmunosuero contra inmunoglobulinas humanas	183
IV.B. <i>Efecto de las inmunoglobulinas de SHu CaMa(+)</i> <i>sobre las células MMT</i>	191
IV.C. <i>Suero de mujeres con cáncer de mama con</i> <i>efecto de diferenciación glandular mamaria ..</i>	202
IV.C.1. Observación del efecto de diferenciación celular	202
IV.C.2. Caracterización de los factores responsables del efecto diferenciador ...	206
IV.C.3. Desarrollo del fenómeno	207
IV.C.4. Efecto de la temperatura sobre proliferación y diferenciación	210
IV.C.5. Necesidad de la presencia del factor de diferenciación para la manifestación y conservación del fenómeno	213

IV.CH. <i>Reacciones humorales y celulares cruzadas</i> entre los carcinomas mamarios humano y murino	219
IV.CH.1. Pruebas de tumorigenicidad	221
IV.CH.2. Inter-relaciones entre sueros sanguíneos y linfocitos humanos y murinos	221
IV.CH.2.a. Cultivo de células linfoides	221
IV.CH.2.b. Observación de los efectos de los linfocitos humanos y murinos sobre las células MMT	227
IV.D. <i>Caracterización de los antígenos responsables</i> <i>de las reacciones cruzadas entre las células</i> <i>de los carcinomas mamarios humano y murino ...</i>	230
IV.D.1. El problema de los virus oncogénicos	233
IV.D.2. Observaciones en las células MMT	234
V. DISCUSION	251
V.A. <i>Introducción</i>	251
V.B. <i>Análisis de los resultados</i>	260
V.B.1. Sueros tóxicos y no tóxicos	262
V.B.2. Aislamiento y caracterización de las inmunoglobulinas reactivas	265
V.B.3. Estudio del efecto de diferenciación glandular mamaria	269
V.B.4. Inmunidad celular	273
V.B.5. Reacciones humorales cruzadas entre los carcinomas mamarios humano y murino	274

V.B.6. Utilidad potencial de algunos productos de las células cancerosas como marcadores tumorales o como indicadores de pronóstico	287
VI. CONCLUSIONES	294
VII. BIBLIOGRAFIA	299

PROLOGO

En la actualidad se conocen muchos datos de la virología e inmunología del cáncer de mama, tanto humano como murino.

Numerosos investigadores han trabajado en este campo encontrando relaciones serológicas entre el cáncer de mama humano y el virus del tumor mamario murino (MMTV), así como diversas homologías entre los ácidos nucleicos de ambos.

En este trabajo hemos querido investigar algunos aspectos de este interesante problema, intentando ver las posibles relaciones entre las reacciones humorales y celulares del carcinoma ductal infiltrante de mama en mujeres premenopáusicas y del adenocarcinoma mamario murino, que según la subcepa de ratones o la sublínea celular "in vitro" contienen en algunos casos partículas de MMTV maduro y en otros casos provirus incorporados al genoma celular. Se trata pues de un modelo experimental cruzado que es a la vez completo y complejo.

Durante el estudio se observó que los sueros de algunas pacientes producían la muerte de las células xenogénicas cancerosas, mientras que los sueros de otras pacientes inducían su diferenciación (reacciones por anticuerpos y por un factor de diferenciación, respectivamente).

De aquí partió el estudio, en cuyo curso, además de estos factores humorales, se observaron reacciones de linfotropismo y linfotoxicidad de los linfocitos de pacientes con cáncer de

mama sobre las células MMT, que varían con los suplementos añadidos al medio de crecimiento del cultivo "in vitro".

En el trabajo se intentan aclarar algunos puntos de los fenómenos encontrados y, eventualmente, buscar posibles aplicaciones a la clínica, animados por algunos de los resultados obtenidos.

I. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

El cáncer de mama es una de las enfermedades más frecuentes y serias de la mujer. Es la patología oncológica responsable de la mayor morbilidad y mortalidad de la mujer adulta joven. Ha sido y es objeto de la mayor variedad de procedimientos diagnósticos y terapéuticos. Es quizá uno de los tumores humanos que dispone de los modelos experimentales más complejos y diversos.

De todos los tumores, es en el que se han descrito relaciones con las posibles causas y situaciones más variadas: hormonas, virus, medicamentos, radiaciones, implantes, campos magnéticos, situación inmunológica, raza, hábitos culturales, status económico, conducta sexual, embarazos, partos, abortos, amamantamiento, dieta, estrés, etc.

A mí en particular me ha interesado especialmente la descripción de reacciones cruzadas entre el cáncer mamario humano y murino. Por ello, en el presente trabajo me propuse como objetivo confirmar la existencia de reacciones cruzadas e intentar aclarar las inter-relaciones entre el carcinoma ductal infiltrante de mama humano y el adenocarcinoma mamario murino, procurando dar una explicación razonada de los resultados.

No resistí la tentación de comenzar el trabajo con una revisión, sin dejar de tener presentes algunos aspectos que

aparentemente quedan lejos del problema central de la tesis (como desarrollo embriológico, histogénesis y clasificaciones clínicas), pero que, a mi entender, son importantes porque el principal modelo debe de ser el del propio ser humano y el del paciente que, al fin y al cabo, es el motivo de nuestra inquietud.

Para conocer bien el tema, hice un amplio recorrido de la literatura científica y médica, tratando de recoger con cierto detalle los principales hechos sobre virología e inmunología del cáncer mamario humano y murino.

Para la realización de este trabajo fue necesario utilizar un gran número de técnicas experimentales. Considerando mis dificultades para poder disponer y procesar una muestra grande de pacientes y con objeto de hacer los resultados lo más homogéneos posible, seleccioné únicamente enfermas premenopáusicas, todas con un sólo tipo histológico de tumor (el más frecuente), carcinoma ductal infiltrante, que constituye el 76 % del total de los carcinomas mamarios.

En nuestra muestra, el 60 % presentaron ganglios linfáticos regionales invadidos.

Como controles utilizamos un grupo de mujeres sanas no embarazadas y otro pequeño grupo de mujeres sanas embarazadas.

De las mujeres se extrajeron suero sanguíneo y linfocitos, para emplearlos como se indicará oportunamente.

Las reacciones serológicas cruzadas y otras interrelaciones inmunológicas y víricas fueron estudiadas utilizando

adenocarcinomas mamarios espontáneos de la cepa homocigótica de ratones C3H/He y cultivos "in vitro" de células de la línea MMT, establecida a partir de un adenocarcinoma mamario de un ratón F1(C57Bl x A).

Las pruebas de tumorigenicidad de las células MMT se hicieron en ratones Swiss. Estos mismos fueron inmunizados con células MMT y aprovechado su suero y linfocitos.

Para la preparación de inmunosueros se emplearon conejos de raza neozelandesa, grandes y buenos productores de anticuerpos. Como antígenos se utilizaron sueros e inmunoglobulinas humanas, células MMT y C3H/He o membranas de las mismas y MMTV.

Algunos fenómenos fueron estudiados morfodinámicamente mediante cinefotomicrografía de intervalos en contraste de fases.

Los tumores mamarios de ratón C3H/He fueron también utilizados para el aislamiento y purificación del virus de Bittner del tumor mamario o MMTV.

Los objetivos iniciales del trabajo consistieron en estudiar los efectos de los sueros sanguíneos y los linfocitos de las mujeres con cáncer de mama y de las mujeres sanas sobre una línea establecida "in vitro" de células de adenocarcinoma mamario de ratón.

En el curso de estos estudios se realizaron hallazgos que consideramos de suficiente interés como para profundizar en ellos, desarrollando incluso técnicas específicas para algunos

propósitos.

Al final se exponen las principales conclusiones que se pueden derivar de nuestro trabajo.

II. REVISION DEL PROBLEMA DEL CANCER DE MAMA

El problema del cáncer de mama es de gran relieve, ya que en muchos países representa en la actualidad el tumor maligno más frecuente en la mujer. Se calcula que alrededor de un 7-9% de las mujeres lo desarrollarán en el transcurso de su vida. A su gran morbilidad añade una mortalidad elevada y es, en muchos países, una de las principales causas de muerte en las mujeres.

II.A. DESARROLLO EMBRIOLOGICO E HISTOGENESIS DE LA MAMA

Las mamas están formadas por glándulas rodeadas de tejido conjuntivo y tejido adiposo y recubiertas en su superficie por piel. Las glándulas confluyen en conductos de calibre creciente que finalmente terminan en los canales secretores desembocan en el pezón.

La primera manifestación de la glándula mamaria en la especie humana se produce al final de la sexta semana de la vida embrionaria, presentándose como un engrosamiento del ectodermo a lo largo de dos líneas llamadas líneas mamarias o pliegues mamarios que van desde la axila hasta la ingle del mismo lado. Las células epiteliales crecen penetrando el mesénquima subyacente, lo que suele realizarse sólo en un pequeño segmento de la línea mamaria localizada a nivel

torácico, aunque en ocasiones se desarrollan glándulas suplementarias a otros niveles del pliegue mamario, dando lugar a mamas supernumerarias.

Con el desarrollo del embrión, en el lugar en que se desarrollarán las mamas las células epiteliales forman un pequeño acúmulo de 16 a 24 brotes de células epiteliales que penetran en el mesénquima subyacente en distintas direcciones. Cada uno de estos cordones durante el período fetal se ramifica y se canaliza, formando los conductos galactóforos y dando lugar a una glándula exocrina compuesta cuyos conductos desembocan inicialmente en una pequeña fosa epitelial que posteriormente se convierte en el pezón por la proliferación del mesénquima subyacente.

Esta es la situación de la mama en el momento del nacimiento, no existiendo una diferencia notable entre ambos sexos.

El desarrollo de la mama femenina en el período prepuberal es debido fundamentalmente al estradiol (E), pero para que se produzca el verdadero desarrollo alveolar es necesaria la acción sinérgica de la progesterona (P), en una proporción E:P entre 1:2 y 1:100. Las mamas aumentan de volumen, en su mayor parte por acumulación de grasa en el tejido conectivo que rodea los lóbulos y los lobulillos. El desarrollo de los conductos epiteliales se produce también, pero es menos notable que el hecho anterior.

En el varón, el cambio de las mamas en la pubertad es

mínimo o nulo; cuando ocurre agrandamiento de la mama del varón, se produce de forma similar a la mujer y da lugar a la denominada ginecomastia.

II.B. ESTRUCTURA HISTOLOGICA DE LA MAMA EN REPOSO

La mama en reposo está formada por 15 a 20 lóbulos localizados en la región profunda de la mama en forma radial respecto al pezón, y están separados entre si por tejidos conjuntivo denso, rico en células adiposas, o tejido conjuntivo interlobular. El lóbulo está formado por un canal secretor, llamado también canal interlobular o galactóforo de primer orden, formado por epitelio pavimentoso estratificado no queratinizado con una membrana basal que lo separa del tejido interlobular subyacente dilatado en su porción terminal o sinus lactífero, que se abre en un poro galactóforo a nivel del pezón.

Cada lóbulo está subdividido en lobulillos, los cuales están separados por tejido conjuntivo denso rico en células adiposas o tejido conjuntivo interlobulillar, que, al igual que el tejido conjuntivo interlobular, proviene de la capa reticular de la dermis de la piel de la mama. Cada lobulillo posee un canal excretor interlobulillar o galactóforo de segundo orden, que nace de una división dicotómica del canal galactóforo de primer orden. A su vez, los canales galactóforos de segundo orden tienen una ramificación dicotómica dando las

ramificaciones terminales o canales intralobulillares, en cuyas terminaciones proliferan las porciones secretorias túbulo-alveolares. Estos canales están rodeados por tejido conectivo celular, llamado tejido conjuntivo intralobulillar, que contiene fibroblastos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

Durante los ciclos menstruales, se producen cambios mamarios, destacan en la fase estrogénica un moderado estímulo proliferativo de las células epiteliales que se inhibe en la fase progestagénica. Al final de esta fase se observan nuevamente modificaciones que se se deben fundamentalmente a vasodilatación y edema del tejido conjuntivo.

En la menopausia, la disminución de estrógeno y progesterona da lugar a una atrofia progresiva del sistema canalicular excretor y de los túbulo-alvéolos, retornándose a un estado que morfológicamente es bastante similar al prepuberal.

II.C. CAMBIOS MAMARIOS DURANTE EL EMBARAZO

Durante el embarazo, diversas hormonas como la prolactina, la progesterona, el estrógeno y el lactógeno placentario humano, intervienen en las modificaciones de las mamas, además de requerir la acción permisiva de otras hormonas (insulina, tiroxina, glucocorticoides, hormona de crecimiento).

En la primera etapa del embarazo se observa un incremento

importante del sistema de conductos, con crecimiento y rápida ramificación de las porciones terminales del sistema canalicular. De esta forma, se originan muchos túbulo-alvéolos, porción secretora de la glándula, compuestos por una sola capa de células cilíndricas. También se observan células mioepiteliales curvas en su perifería. Con el desarrollo de este sistema, el tejido conjuntivo intralobulillar va disminuyendo, quedando reducido a unos tabiques muy finos ricos en capilares. También el tejido conjuntivo interlobulillar queda adelgazado.

En los últimos meses, el desarrollo túbulo-alveolar se lentifica. Las células empiezan a segregar un líquido rico en proteínas y pobre en lípidos, constituyendo el denominado calostro, que se acumula en los alvéolos y conductos.

II.CH. CAMBIOS MAMARIOS DURANTE EL PERIODO DE LACTANCIA

En el establecimiento de la secreción láctea, además de las hormonas permisivas anteriormente indicadas, juegan un papel esencial otras hormonas como la prolactina y la oxitocina, cuya producción se estimula cuando las mamas se vacían al amamantar. Entre las mamadas la leche se acumula en los túbulo-alvéolos y es expulsada cuando el bebé vuelve a mamar. Así, la producción de leche desaparece si las mamas no son evacuadas; también se inhibe con la administración de estrógenos, por acción directa sobre la mama, o de

bromocriptina, que inhibe la producción de prolactina por la hipófisis.

La secreción de leche no se produce hasta pasados dos o tres días del parto; durante estos días, lo que se secreta es el calostro.

El sistema de conductos y alvéolos presenta signos de marcada actividad secretora, con células prismáticas altas llenas de gotitas de lípidos y granos de secreción. La secreción de leche, se realiza de forma mixta, siendo apocrina para las gotitas de lípidos y merocrina para los granos de secreción proteica.

II.D. CLASIFICACION HISTOLOGICA DEL CANCER MAMARIO

La realización de una clasificación histopatológica del cáncer de mama, además de establecer el diagnóstico, tiene valor a la hora de hacer una valoración pronóstica de la paciente y de intentar un mejor conocimiento de la biología de dicha enfermedad.

Ya describimos anteriormente las principales estructuras anatómicas de la mama. Las glándulas desembocan en conductos epiteliales de calibres crecientes: conductos glandulares pequeños, medianos y grandes, inmersos en estroma. Los tumores se van a desarrollar fundamentalmente a partir de dichos conductos, preferentemente de los grandes (figura 1).

En la tabla I tenemos una clasificación histológica de los

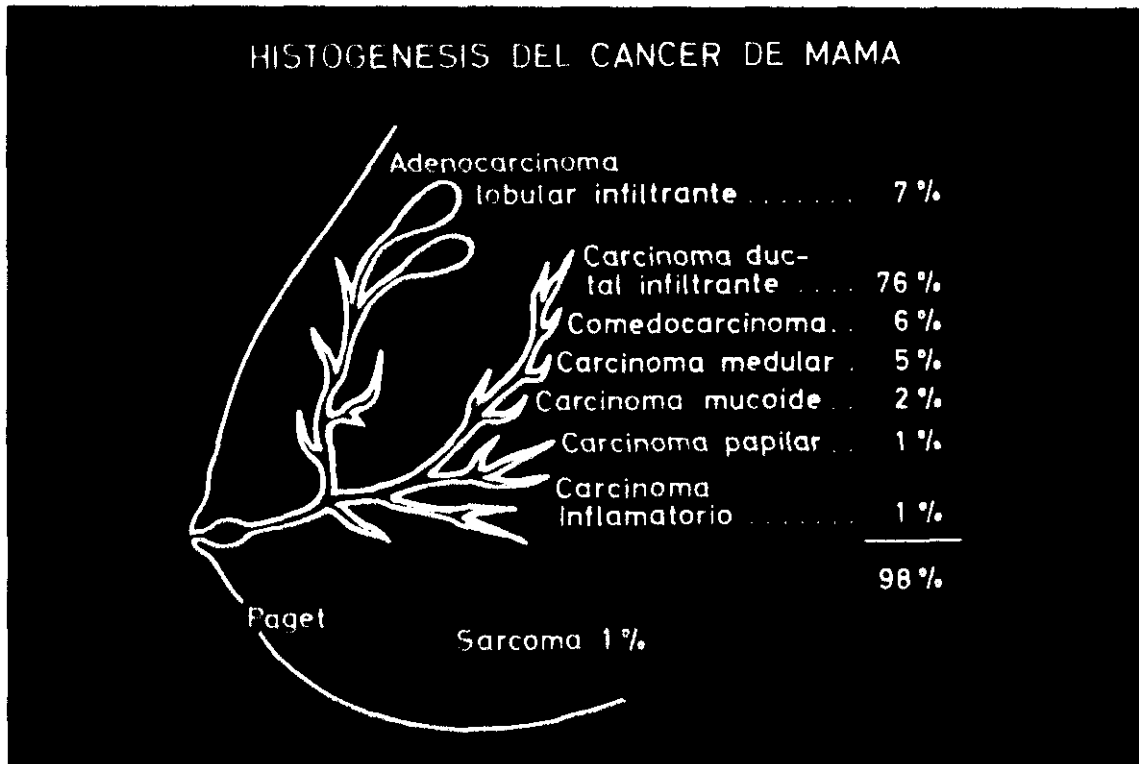


Figura 1

Frecuencia de los tipos morfológicos del cáncer de mama

CARCINOMAS DUCTALES

- Carcinomas intraductales o DCIS
 - Sólido u obstructivo (comedocarcinoma)
 - Papilar
 - Cribiforme
- Carcinomas ductales infiltrantes

CARCINOMA LOBULILLAR

- Carcinoma intralobulillar o LCIS
 - Tipo A
 - Tipo B
- Carcinoma lobulillar invasivo

CARCINOMA TUBULAR**CARCINOMA MUCINOSO O COLOIDE****CARCINOMA PAPILAR****CARCINOMA MEDULAR****CARCINOMA ADENOQUISTICO****FORMAS RARAS DE CÁNCER MAMARIO**

- Carcinoma secretor juvenil
- Carcinoma escamoso
- Carcinoma metaplasico
 - Epitelial o carcinoma apocrino
 - Mesenquimatoso
 - Osteosarcoma
 - Condrosarcoma
 - Mixto o carcinosarcoma
 - Secretor de lípidos

- Metaplasia escamosa
- Carcinoma histiocitoide
- Carcinoma argirófilo o carcinoide

FORMAS ESPECIALES DE CARCINOMAS MAMARIOS

- Enfermedad de Paget
- Carcinoma inflamatorio

SARCOMAS DE MAMA

- Puros (fibrosarcomas, liposarcomas, neurosarcomas, etc.)
- Mixtos
- Cistosarcoma phyllodes

METÁSTASIS DE OTROS TUMORES NO MAMARIOS EN MAMA

- Linfoma
- Melanoma
- Otros

Tabla I

Clasificación histológica de los tumores de mama

tumores de la mama.

1. **Carcinomas ductales.** Es el cáncer mamario que se presenta con más frecuencia. Existen dos formas:

1.1. **Carcinomas intraductales.** Los carcinomas ductales "in situ" (DCIS), se producen en el epitelio ductal, dentro de la luz de los conductos mamarios, sin afectación del estroma. Con frecuencia son multifocales. El pronóstico es muy bueno, presentando una probabilidad de colonización ganglionar axilar muy baja. Por su estructura microscópica, se conocen tres tipos:

a) Carcinomas papilares. Presentan una configuración papilar. Suponen aproximadamente un 1 % de los cánceres mamarios.

b) Carcinoma intraductal sólido o comedón. Presenta un crecimiento más denso de los conductos, con detritos centrales característicos.

c) Carcinoma intraductal cribiforme. Su grado de necrosis es pequeño.

1.2. **Carcinomas ductales infiltrantes.** En ellos, no se reconoce ninguna estructura histológica especial, encontrándose distintos grados de fibrosis. Suponen aproximadamente el 70-80 % de los cánceres de mama. Es el grupo de peor pronóstico, hallándose con frecuencia afectación ganglionar axilar.

2. **Carcinoma lobulillar.** Se origina de los conductos pequeños o terminales. Según exceda o no los límites del lóbulo o conducto terminal del que se originó, puede ser invasivo (5-

10 %) y no invasivo o "in situ" (LCIS) (5 %).

2.1. Carcinoma lobulillar invasivo. Es muy típica la disposición lineal de las células, en fila india. Con frecuencia se asocia a otros tipos neoplásicos ductales. Su pronóstico es similar al del carcinoma ductal infiltrante.

2.2. Carcinoma intralobulillar o LCIS. Tiene una incidencia de mitosis baja. Aproximadamente un 70 % de los casos son multicéntricos en la misma mama y un 25-30 % bilaterales. Se presenta fundamentalmente en mujeres premenopáusicas. No es palpable. Presenta dos variedades diferentes, según la población celular: cuando la población celular es más homogénea, se habla de variedad tipo A; cuando posee mayor polimorfismo y menor cohesividad celular, se habla de variedad tipo B. En un 25-30 % de las mujeres, con un período de latencia largo, se desarrolla un carcinoma lobulillar infiltrante.

3. Carcinoma tubular. Originado igualmente a partir de los conductos grandes, presenta forma de túbulo y es altamente diferenciado. Con frecuencia presenta componentes de carcinomas intraductales. En un alto número se encuentra en la "cicatrices radiales", aunque no todos se originarían de ellas. Supone un 1-2 % del total. Presenta un buen pronóstico.

4. Carcinoma mucinoso o coloide. Se origina en los conductos grandes. Las células epiteliales se hallan en una matriz de mucina. Supone aproximadamente el 3-5 % del total. Se presenta en mujeres ancianas, con un pico máximo de incidencia

en los 60 años. Su pronóstico es mejor cuanto mayor es el componente mucinoso.

5. Carcinoma papilar. Originado de los conductos grandes. Supone un 1-1,5 % del total de cánceres mamarios. Es rara la afectación ganglionar axilar.

6. Carcinoma medular. Se origina a partir de los conductos grandes. Es rico en parénquima y se caracteriza por una infiltración abundante de células mononucleares (linfocitos T, células plasmáticas y macrófagos) en la periferia. Supone un 5-7 % del total de cánceres de mama. Es uno de los de mejor pronóstico, presentando un índice de metástasis y recidiva bajo, con una supervivencia a los 5 años entre 69-82,7 % (Moore y Floote, 1949; Richardson, 1956; McDivitt y col, 1968), aunque esta diferencia con los carcinomas ductales disminuye a partir de los 10 años Schwartz, 1969; Haagensen, 1971; Flores y col, 1974).

7. Carcinoma adenoquístico. Ocupa aproximadamente el 0,4-1 % de todos los cánceres de mama. Son más frecuentes en la sexta y séptima décadas. A veces se localiza en la región del pezón y de la aréola. Presenta una evolución favorable.

8. Formas raras de cáncer mamario:

8.1. Carcinoma secretor juvenil. Es un tumor raro, siendo la neoplasia de mama más común en niñas y jóvenes. Presenta una evolución favorable.

8.2. Carcinoma escamoso. Se diagnostica cuando se observe la formación de queratina. Debe investigarse la existencia de

un tumor dérmico. Pronóstico favorable.

8.3. Carcinoma metaplásico:

- a) Epitelial o carcinoma apocrino. Deben distinguirse de los tumores primitivos de glándulas sudoríparas.
- b) Mesenguimatoso. Pronóstico desfavorable. Puede

ser:

- b.1) Osteosarcoma.
- b.2) Condrosarcoma.
- b.3) Mixto o carcinosarcoma. Supone el 0,1 % de los carcinomas mamarios. Maligno en sus dos componentes. Evolución desfavorable.
- c) Secretor de lípidos. Tiene un grado de madurez alto, pero su pronóstico es malo.

8.4. Metaplasia escamosa. Tumor raro. Evolución desfavorable.

8.5. Carcinoma histiocitoide.

Es una modalidad muy rara que posee abundantes histiocitos y fibroblastos procedentes de los mismos que producen una fibrosis variable.

8.6. Carcinoma argirófilo o carcinoide.

Son tumores muy raros en la mama compuestos por células argentafines (reducen el nitrato de plata amoniacal) que segregan serotonina (5-hidroxitriptamina) y otras sustancias con carácter hormonal.

9. Formas especiales de carcinomas mamarios:

9.1. Enfermedad de Paget. Histopatológicamente, podemos

encontrar cualquiera de los diferentes tipos tumorales, apareciendo con mayor frecuencia la asociación con carcinoma intraductal o ductal infiltrante, observándose en el epitelio del pezón nidos de células cancerosas. Representa un 1-4 % del total de cánceres de mama. Su pronóstico depende del tipo histológico del tumor subyacente.

9.2. Carcinoma inflamatorio. El término de carcinoma inflamatorio es un término clínico, referido a la sintomatología típica que presenta este tipo tumoral: enrojecimiento y calor. El cuadro histopatológico corresponde a células cancerosas en los linfáticos subdérmicos, pudiendo ser un tumor ductal o, con más frecuencia, lobulillar. Representa un 1-2 % de todos los cánceres de mama. Su pronóstico es malo y con frecuencia ya existe afectación ganglionar regional en el momento del diagnóstico

10. Sarcomas de mama. En la mama pueden presentarse prácticamente todos los tipos de sarcoma, pudiendo ser puros (fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma, miosarcoma, hemangiosarcoma, linfangiosarcoma, neurosarcoma) o mixtos.

La variedad cistosarcoma phyllodes consiste en un fibroadenoma gigante por gran crecimiento de un fibroadenoma intracanalicular con estroma muy abundante, que llega a enmascarar a la proliferación epitelial. Pese a su denominación es un tumor casi siempre benigno, que ocasionalmente se maligniza y produce metástasis. Se ha descrito sólo en mujeres.

11. **Metástasis en mama de tumores no mamarios.** Los tumores extramamarios que producen metástasis en mama presentan una incidencia máxima más precozmente que los carcinomas primarios de mama. Suponen el 1-3 % de los tumores mamarios malignos. Entre los más frecuentes encontramos linfoma en etapas tardías, muy parecidos anatomopatológicamente a los cánceres lobulillares difusos; para su diferenciación pueden buscarse marcadores citoquímicos como queratina, caseína y lecitinas. Entre los tumores epiteliales extramamarios más importantes encontramos al melanoma maligno, carcinoma uterino, carcinoma ovárico y carcinoma bronquial.

II.E. CLASIFICACION CLINICA DEL CANCER MAMARIO

Si el estudio anatomopatológico del tumor, es importante porque es distinta la evolución biológica y la historia natural de cada tumor, en la práctica oncológica es también imprescindible disponer de una clasificación según criterios clínicos para poder hacer una valoración pronóstica y terapéutica de la enfermedad.

La clasificación TNM, que se recoge en la tabla II, es ampliamente empleada y es la base de la clasificación por estadios del "American Joint Committee", descrita en la tabla III.

T → TUMOR PRIMARIO

Tis - Carcinoma "in situ", carcinoma no infiltrante o enfermedad de Paget de la mama sin tumor detectable

Nota: si se detectase tumor en la enfermedad de Paget, se clasificaría según el tamaño del mismo.

TO - No hay prueba del primario.

T1 - Tumor ≤ 2 cm. de diámetro:

T1a - No fijación a fascia pectoral subyacente y/o músculo

T1b - Fijación a fascia pectoral subyacente y/o músculo

T2 - Tumor > 2 cm. y ≤ 5 cm. de diámetro:

T2a - No fijación a fascia pectoral subyacente y/o músculo

T2b - Fijación a fascia pectoral subyacente y/o músculo

T3 - Tumor > 5 cm. de diámetro:

T3a - No fijación a fascia pectoral subyacente y/o músculo

T3b - Fijación a fascia pectoral subyacente y/o músculo

Nota: en T1, T2 y T3 puede presentarse retracción de piel o pezón o alteraciones de la piel distintas a T4b sin influir en la clasificación TNM.

T4 - Cualquier tamaño tumoral con infiltración de la piel o de la pared de la mama

Nota: la pared torácica incluye las costillas, los músculos intercostales y el músculo serrato anterior, pero no los músculos pectorales.

T4a - Fijación a pared mamaria

T4b - Con edema del brazo, ulceración o infiltración de piel (incluyendo la piel de naranja) o con nódulos cutáneos de la misma mama

T4c - T4a y T4b a la vez

TX - No existen los requisitos mínimos para la evaluación del tumor primario

Nota: los carcinomas inflamatorios deben catalogarse en un grupo aparte.

N → GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES

N0 - Ganglios axilares homolaterales no palpables

N1 - Palpación de ganglios axilares homolaterales móviles

N1a - Los ganglios no se consideran metastásicos

N1b - Los ganglios se consideran metastásicos

N2 - Ganglios axilares homolaterales fijos entre sí o a otras estructuras y considerados metastásicos

N3 - Ganglios supraclaviculares o infraclaviculares homolaterales considerados metastásicos o presencia de edema del brazo.

Nota: el edema del brazo puede ser producido por obstrucción linfática; los ganglios pueden entonces no ser palpables.

NX - No existen los requisitos mínimos para la evaluación de los ganglios linfáticos regionales

M → METÁSTASIS A DISTANCIA

M0 - No hay evidencia de metástasis a distancia

M1 - Evidencia de metástasis a distancia

MX - No existen los requisitos mínimos para la evaluación de metástasis a distancia

Tabla II

Clasificación del cáncer de mama según el sistema TNM

ESTADIO	CLÍNICA		
I	Tumor primario < 2 cm. Si son palpables, los ganglios no parecen contener metástasis. No hay metástasis a distancia. Incluye, según la clasificación TNM:		
	T1a/T1b	N0/N1a	M0
II	Tumor primario > 2 cm. y ≤ 5 cm. Si son palpables los ganglios, no están fijos. No hay metástasis a distancia. Incluye, según la clasificación TNM:		
	T0/T1a/T1b	N1b	M0
	T2a/T2b	N0/N1/N2	M0
III	Tumor > 5 cm. o fijo pared torácica o invasión a piel. Ganglios supraclaviculares palpables. No hay signos de metástasis a distancia. Incluye, según la clasificación TNM:		
	T1a/T1b/T2a/T2b	N2	M0
	T3a/T3b	N0/N1/N2	M0
IV	Metástasis a distancia. Incluye, según la clasificación TNM:		
	T4	cualquier N	cualquier M
	cualquier T	N3	cualquier M
	cualquier T	cualquier N	M1

Tabla III

Clasificación clínica del cáncer de mama según el "American Joint Committee"

II.F. ETIOPATOGENIA DEL CANCER MAMARIO

La etiopatogenia del cáncer mamario, tanto en la especie humana como en los animales, es muy compleja, habiéndose demostrado la intervención de factores genéticos, hormonales, físicos, químicos, ambientales, inmunológicos y víricos.

II.F. 1. FACTORES GENERALES

(Cole, 1974)

1.a. Sexo

El 99 % de los cánceres de mama se dan en mujeres y el 1 % en varones. Dentro de estos últimos, presentan un mayor riesgo los pacientes afectados por el síndrome de Klinefelter o con ginecomastias hormonales no fisiológicas.

1.b. Edad

Porro Novo (1986) realizó una revisión entre los años 1978 y 1984 sobre la aparición de nódulos mamarios en general en la mujer, observando que el 71,9 % de ellos aparecieron antes de los 40 años, siendo aproximadamente el 3,7 % malignos, en cuyo caso, la incidencia de enfermedad cancerosa era más frecuente por encima de los 40 años.

Durante los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia del cáncer de mama, fundamentalmente a expensas de las mujeres de edad más avanzada, aunque también ha sufrido un ascenso importante la incidencia en mujeres jóvenes. Un 0,09 %

se da por debajo de los 20 años y un 1,8 % por debajo de los 30 años; aproximadamente el 75 % se presenta por encima de los cuarenta años y el 6 % por encima de los 50 años. El pico de máxima incidencia está entre los 45-59 años.

En los varones, la aparición del cáncer de mama se produce a edades más tardías que en las mujeres, con un promedio de edad de 60 años.

Se ha visto que, cuanto más vive la mujer más probabilidades tiene de padecer un cáncer de mama.

1.c. Raza y demografía

Diversos estudios han demostrado que existe una mayor incidencia de cáncer de mama en las mujeres occidentales, de raza aria y anglosajona, y menor en las mujeres de los países orientales y de raza negra. Aun dentro de la raza, se ve una relación directa entre nivel socioeconómico y cultural y cáncer mamario, aumentando su incidencia en el medio urbano respecto al rural.

Se ha observado que estas diferencias se deben en parte a factores ambientales, ya que mujeres que proceden de países con un bajo índice de incidencia de cáncer de mama lo aumentan al vivir en países que presentan una incidencia elevada.

Uno de estos factores parece ser el tipo de dieta, como, por ejemplo, el exceso de grasa, existiendo mayor riesgo de padecer cáncer de mama la mujeres obesas, riesgo aún mayor cuando a la obesidad se asocia la diabetes y la hipertensión arterial. Un efecto protector podrían tenerlo el pescado, el

arroz, el maíz y los frijoles. Así mismo, la vitamina E parece disminuir la sensibilidad y la nodularidad de la mama en la enfermedad fibroquística, patología con cierto potencial de malignización.

1.ch. Predisposición genética

La respuesta de cada organismo al desarrollo de un cáncer viene dada por la constitución genética del individuo en particular (Anderson DE, 1974 y 1977). Diversos investigadores (Anderson DE, 1973; Andrés y col, 1975; Anderson y Badzioch, 1985a y 1985b) han encontrado varios hechos que evidencian la existencia de una predisposición genética, entre los que se hallan:

- La descripción de la existencia de familias con sobrecarga de cáncer mamario al estudiar varias generaciones, aumentando la incidencia en varones respecto a la población en general.

- Aumento del riesgo de padecer cáncer de mama en los descendientes de pacientes con dicha enfermedad; este riesgo aumenta si el cáncer de mama era bilateral.

- Del estudio de la enfermedad en gemelas, se observa que existe un aumento en las homocigóticas respecto a las heterocigóticas.

1.d. Lesiones mamarias previas

Para las lesiones benignas de la mama no epiteliales no existen predisposición para la formación de un cáncer. Sin embargo, existe un potencial de malignización de las lesiones

epiteliales como mastopatía fibroquística, con un riesgo de aparición de un cáncer de mama 2--2,5 veces mayor, hiperplasias ductales atípicas, con un riesgo 2-3 veces mayor, o hiperplasias lobulillares atípicas, con un riesgo 5 veces mayor.

Las pacientes con cáncer de mama presentan un riesgo 5 veces mayor a padecer cáncer de la otra mama, asociándose el riesgo a una perspectiva de vida prolongada, a la realización de un diagnóstico precoz, a que el tumor sea no infiltrante o infiltrante de buen pronóstico, a edad superior a 40 años, a un buen estado general, a historia familiar de cáncer de mama. Este riesgo también aumenta en pacientes con otros tipos de tumores malignos como carcinoma ovárico o carcinoma endometrial.

1.e. Parto y lactancia

Según distintos estudios realizados por diversos autores, existe una clara relación inversa entre número de partos y riesgo de padecer cáncer de mama, siendo 2-3 veces mayor en nulíparas (Thomas y Lilienfeld, 1976; Dunn, 1969; Fraumeni y col, 1969 que en mujeres que han tenido hijos. Fundamentalmente, los partos parecen disminuir el riesgo de desarrollar sobre todo el cáncer de mama que aparece en la postmenopausia.

Respecto a la importancia de la edad del primer parto, algunos estudios indican que se produce una disminución significativa de la incidencia cuando el primer embarazo a

término se produce antes de los 21 años, siempre y cuando vaya seguido de otros embarazos a término (MacMahon y col, 1973; Blot, 1980). Los mismos autores señalan que este efecto protector no se observa en el caso de producirse abortos. Por otro lado, se observa que si el primer parto precoz no se sucede de otros, no se registra el efecto protector.

Se ha visto también que, además de las nulíparas, existe otro grupo de mujeres que tiene un riesgo muy elevado, alrededor de 2,5 veces más, de desarrollar cáncer mamario, el de las primíparas de más de 35 años.

Donegan (1977) observó que el 17 % de los cánceres de mama en la mujer aparece durante la edad reproductiva. Según el mismo autor, el 3 % aparece durante el embarazo, con un pico de incidencia en la cuarta década de vida, presentando un pronóstico menos favorable.

Respecto la lactancia materna, existen estudios contradictorios. Para unos, parece existir cierto efecto protector de la enfermedad en las mujeres que tuvieron un período de lactancia largo (Levin y col, 1964; Schaefer y col, 1975). En la actualidad se piensa que este factor no influye mucho.

1.f. Factores hormonales

Desde hace varios años es conocida la hormonodependencia de algunos tipos de cáncer de mama.

Está bien clara la **dependencia del medio hormonal en la tumorigénesis mamaria en los ratones**, produciéndose casi

exclusivamente en hembras, siendo la tasa de crecimiento mayor durante la preñez, así como en machos tratados con hormonas femeninas; el tratamiento con hormonas esteroideas y polipeptídicas (insulina, PRL, GH, factor lactógeno placentario) incrementa la incidencia tumoral, lo mismo que el aumento de la producción de hormonas adrenocorticales; los tumores mamarios y las glándulas mamarias lactantes presentan en su superficie receptores para corticoides y esteroides sexuales; los glucocorticoides estimulan 10-20 veces la producción de virus, (Ringold, 1979) aun en ausencia de suero, en líneas establecidas de tumores mamarios de ratón y aumentan la presencia de cuerpos de inclusión citoplásmicos debidos a MMTV o partículas A en tumores mamarios murinos.

Se piensa que el ambiente hormonal influye sobre la susceptibilidad de la mama a los cancerígenos, observándose que una actividad menstrual prolongada (en relación con la actividad estrogénica acumulativa), bien por menarquia temprana (antes de los 9-12 años) o por menopausia tardía (después de los 50-55 años), presenta un riesgo aumentado de cáncer mamario, estando dicho riesgo disminuido cuando la menopausia, bien natural o artificial, se produce antes de los 37 años. En las mujeres premenopáusicas que desarrollaron cáncer de mama se observó una relación con los niveles de estradiol y estrona procedentes de los ovarios, con menor secreción de estradiol; en las postmenopáusicas, se vio relación con la estrona derivada de la producción de esteroides en las suprarrenales.

Respecto a la progesterona, numerosos investigadores detectaron un cambio del ritmo nictameral de la secreción de dicha hormona, presentando una elevación nocturna no significativamente mayor a la de la mañana en las mujeres con cáncer mamario, como sucede en mujeres las sanas o con patologías mamarias benignas.

Schiu (1981) observó la influencia de la prolactina (PRL) y de las hormonas hipofisarias en la aparición de cáncer de mama. El primer paso para la acción de la PRL sobre las células diana es su unión a un receptor de la superficie celular. Varios estudios han demostrado que los lugares de unión específicos de la PRL, los cuales tienen todas las características de los receptores PRL, están presentes en la biopsia de algunos cánceres de mama humanos. Por razones obvias, las muestras de biopsia no son apropiadas para el estudio a largo plazo de las consecuencias biológicas de la interacción de la PRL con sus receptores. Los cultivos mantenidos de células de cáncer de mama son, por lo tanto, potencialmente útiles para este propósito. Hay varios aspectos: inducción por la PRL de la síntesis de caseína y transporte de aminoácidos en el tejido mamario; inducción por la PRL de la proliferación de células Nb2 (línea celular de un linfoma de rata cuya proliferación depende sólo de la PRL); inducción por la PRL de la luteolisis en la rata; estimulación del transporte de agua a través del amnios humano. Tras estas observaciones, el estudio de los receptores de PRL podría proveer algún

significado biológico de la PRL en el cáncer de mama.

1.g. Factores inmunológicos

En el desarrollo del cáncer mamario es importante el papel de los factores inmunológicos, existiendo predisposición a padecerlo en las mujeres con estados de inmunodeficiencia. Por ello, se intentan buscar diversos marcadores de la inmunocompetencia.

Este punto será ampliamente expuesto en otro apartado, ya que son muy interesantes y pueden contribuir a aclarar algunos aspectos de la etiopatogenia del cáncer de mama, y donde se verán, entre otras cosas, las relaciones inmunológicas entre las células de carcinoma mamario del ratón, los antígenos del MMTV y el carcinoma mamario humano.

1.h. Agentes cancerígenos

Hay estudios que reflejan un aumento del riesgo de cáncer mamario en mujeres con alto consumo del alcohol, así como de diversos fármacos como metildopa, fenotiacina, dextroanfetamina, algunos antidepresivos y algunos antihistamínicos, pudiendo actuar como promotores.

Otros compuestos químicos, como los hidrocarburos policíclicos, tienen efectos carcinogénicos. Lo mismo ocurre respecto la exposición a radiaciones ionizantes, siendo el riesgo mayor cuanto más joven es la mujer expuesta.

II.F.2. VIROLOGIA DEL CANCER MAMARIO

II.F.2.a. Murino

En la etiopatogenia del carcinoma mamario de los animales se conoce la implicación de diversos retrovirus, entre los que se hallan el virus del cáncer mamario murino (MMTV), de tipo B, y el virus de Mason-Pfizer, causante de cáncer de mama en el mono rhesus, que puede presentarse como los tipos C y B.

Las formas de actuación de los virus oncogénicos son diversas. En ratones se ha identificado la transmisión láctea de los oncornavirus, al ser estos secretados por la leche, como sucede con el MMTV. De esta forma, el virus pasa a la descendencia al amamantar las crías, como en las observaciones iniciales de Andervont y Bittner. Además de esta transmisión de virus vegetativos, llamada transmisión horizontal, existe la transmisión vertical por virus ecotrópicos endógenos.

El MMTV es un retrovirus aislado de la leche de ratones con elevada incidencia tumoral, explantes de tumores mamarios productores, células epitelioides establecidas "in vitro" a partir de tumores mamarios de diversas cepas de ratón y líneas celulares epiteliales heterólogas infectadas o inoculadas con MMTV (Ringold, 1979).

Blair (1969), no observó correlación entre la presencia de antígenos víricos de MMTV y desarrollo de tumor mamario en la leche de la primera y segunda lactancia pero sí para las

siguientes.

El MMTV carece de oncogén, pero a través de su región LTR ("long terminal repeat") activa oncogenes celulares.

En la figura 2 representamos una célula de adenocarcinoma mamario de ratón transformada por un virus oncogénico, el MMTV. En su superficie existen antígenos viro-informados, dependientes del código genético del virus, y viro-inducidos, producidos por la acción del virus sobre los genes de la célula.

Se ha visto que las moléculas de ARN celular complementario del MMTV y del virus de Mason-Pfizer del tumor mamario del mono son diferentes en su mayor parte, pero parece existir una parte común.

II.F.2.b. Humano

Desde hace ya algunos años, se conocen muchos datos que apoyan la hipótesis de virus oncogénicos de tipo retrovirus, implicados de alguna manera en varias etapas de la etiopatogenia de carcinoma mamario, tanto humano como murino.

En algunas muestras de leche de enfermas así como de tejido tumoral, ha sido demostrada la presencia de partículas víricas (Seman y col, 1969; Moore y col, 1971) parecidas a las partículas de tipo C. Keydar y col (1973), observaron que en cultivos de células embrionarias humanas junto con células de carcinoma mamario humano o con leche de las pacientes, se

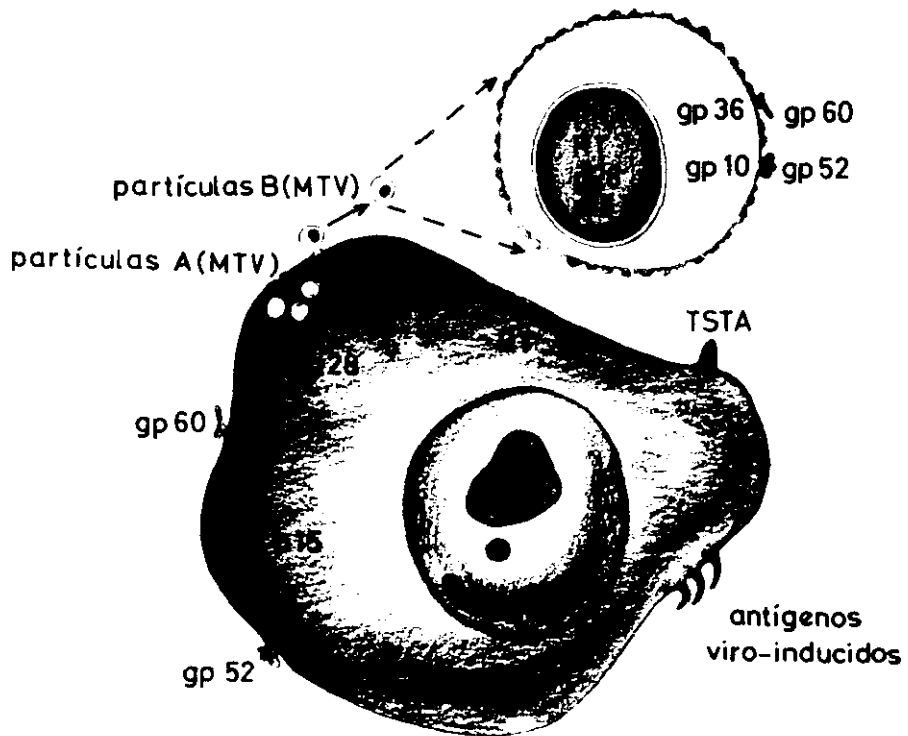


Figura 2

Antígenos viro-informados y viro-inducidos en células transformadas por el virus de Bittner o MMTV en células de la línea celular de adenocarcinoma mamario murino MMT.

producía un virus. Furmanski y col (1974), comunicaron también la replicación de partículas con aspecto de oncornavirus en algunas líneas de cáncer de mama humano establecidas "in vitro". Estos mismos autores vieron que el tejido glandular mamario normal también puede producir y liberar partículas de aspecto vírico. Sin embargo, algunos investigadores consideran que no se puede afirmar que se trate de partículas víricas (Calafat y Hageman, 1973). Lo que es un hecho cierto es que el ARN de MMTV es complementario de algunas regiones del ADN del cáncer de mama y del de la placenta humana.

En relación con la presencia de oncornavirus en la etiopatogenia del cáncer de mama humano, deben tenerse en cuenta algunos hechos que dificultarían su reconocimiento:

- La leche humana destruye fácilmente virus oncogénicos ARN murinos añadidos experimentalmente). Por esta razón, Sarkar y col (1973) y Moore (1974) consideran que encontrar dichos virus en la leche no es fácil, ya que serían eliminados.

- En muchos casos es imposible demostrar la presencia de partículas víricas maduras debido a la incorporación del virus oncogénico al genoma de la célula pero sin que se reproduzcan en forma vegetativa.

- A veces existe una transmisión vertical o generacional, por las células sexuales, de provirus. En otras ocasiones, hay regiones genómicas celulares homólogas de regiones del genoma vírico, pudiendo estar implicados oncogenes celulares activados por genes promotores homólogos de promotores del genoma, como

la región LTR ("long terminal repeat") del MMTV y otros retrovirus, o el oncogén celular activo puede ser homólogo de un oncogén vírico.

La participación de mecanismos virológicos en el cáncer mamario puede hacerse de muy diversas maneras, no necesitando identificarse con la transmisión láctea como sucede en ratones cuando es secretado el virus a la leche. En el caso del carcinoma mamario humano, parece haber virus endógenos ecotrópicos.

Epidemiológicamente se esgrimen apoyos en favor de la participación vírica en el cáncer mamario humano. Entre ellos está el hallazgo de partículas víricas en un 60 % de las mujeres con historia familiar de cáncer de mama mientras que sólo el 5 % de mujeres sin ella las presentaban. No obstante, Henderson (1974) y otros investigadores no confirmaron estos descubrimientos.

Sin embargo, para valorar la participación vírica en la etiopatogenia del cáncer de mama deben considerarse otros hechos, que pueden ser apoyos, desde el punto de vista bioquímico, para esta hipótesis. Así, se ha visto que:

- La transcriptasa inversa o ADN-polimerasa ARN-dependiente existe en las células y en los retrovirus, entre ellos el MMTV. Es la enzima que produce un ADN complementario (ADNc) del ARN 70S vírico. Axel, Gulati y Spielgelman (1972) encontraron que la leche de mujer tiene una actividad de transcriptasa inversa proporcional a la cantidad de partículas

de tipo vírico y de ARN 70S.

Este aumento de la actividad de la transcriptasa inversa se observa en la glándula mamaria normal en desarrollo, en tejido mamario tumoral sin virus y en glándula mamaria lactante (Mukherjee, 1973).

- En los cánceres mamaros humanos existe una transcriptasa inversa, un ARN 60S y un ARN 70S de moléculas similares a las que se han aislado del interior de las partículas víricas del cáncer mamario murino.

- El ADNc retrotranscrito del ARN 70S del MMTV, de tipo B, se hibrida con un ARN unido a los ribosomas que existe en 66 % de las células de carcinoma de mama humano (Axel, Schlom y Spielgelman, 1972; Vaidya y col, 1974). Dicho ADNc no se hibrida con el ARN de tumores benignos de mama.

- Por su parte, el ADNc obtenido por transcripción inversa del ARN del virus de Mason-Pfizer, de tipo C, relacionado con el cáncer mamario del mono rhesus, es también complementario de un ARN extraído de tejido de carcinoma mamario humano (Yeh y col, 1975).

Existen también observaciones muy interesantes hechas con métodos inmunológicos, que serán mencionadas en el capítulo "V Discusión".

II.G. INMUNOLOGIA DEL CANCER DE MAMA

II.G.1. INMUNOLOGIA DEL CANCER MAMARIO MURINO

En las células cancerosas hay notables modificaciones inmunológicas de carácter muy diverso y de difícil interpretación en muchas ocasiones. Se modifican cuantitativamente los antígenos tisulares específicos. Se alteran las proteínas cualitativamente, apareciendo antígenos tumor-asociados (TAA) y tumor-específicos (TSA). Cambian de manera variable los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), llamado complejo HLA en el ser humano y H-A en el ratón. En términos generales, existe una relación inversa entre cantidad de antígenos del sistema H-A y TAA.

Lo más frecuente es que los tumores inducidos por agentes químicos o por virus posean una buena representación de TAA y una disminución significativa de los antígenos H-A. Así sucede con los sarcomas provocados por 3-metilcolantreno (Haywood y McKhann, 1971) o virus polioma (Ting y Herberman, 1971). No obstante, hay excepciones y se puede dar el caso contrario de muy escasa cantidad de TAA coincidente con aumento de antígenos H-2, como sucede en las células transformadas por el virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MuSV) (Tsakvaklies y col, 1974).

En los linfomas de ratón inducidos por el Mo-MuSV existen

unos neoplasmas con aumento de TAA y disminución de antígenos H-2 (Cikes, Friberg y Kelin, 1973) y otros tumores en los que, contrariamente, disminuyen los TAA y aumentan los antígenos H-2 (Fenyö, Klein y Klein, 1968). Estos últimos tumores son formas inmunorresistentes de dichos linfomas.

La existencia de TAA fue descrita para el carcinoma mamario espontáneo del ratón por Heppner y Pierce (1969).

En el adenocarcinoma mamario del ratón se han descrito diversos tipos de TAA. Algunos son genéricos y dan reacciones cruzadas; otros son particulares de cada tumor. Muchos tumores mamarios tienen antígenos embrionarios y fetales. Utilizados como antígenos para la inmunoterapia, los carcinomas mamarios resultan muy escasamente inhibidos (Blair, 1970).

Una demostración de que existen TAA en el cáncer de mama murino de los ratones de la cepa A es la inhibición de su crecimiento mediante irradiación X con 400 rads, que aisladamente es inmunosupresora pero no provoca efectos significativos sobre los tumores, más inmunoterapia adoptiva con células esplénicas alogénicas de ratones CBA inmunizadas contra tumores A (Woodruff y Symes, 1962; Woodruff y Boak, 1965).

Sin embargo, las células alogénicas CBA provocaban reacciones injerto-versus-huésped mortales en la mayor parte de los ratones A, que la irradiación no consigue dominar en otros casos.

La inhibición tumoral se mantuvo y la reacción injerto-

versus-huésped se eliminó cuando se trasplantó el tumor mamario a ratones híbridos F1(CBAXA) administrándoles por vía intravenosa células esplénicas de ratones CBA inmunizadas con los tumores.

En varios tipos de tumores, la inmunoterapia adoptiva con linfocitos sensibilizados con TAA consigue mejores resultados si se combina con inmunoterapia pasiva. Así, el tumor mamario de ratones C3H mantenido en ratones BALB/c es inhibido más marcadamente con linfocitos sensibilizados y suero sanguíneo con anticuerpos antitumorales (Batchelar, Boyse y Gorer, 1960).

También suele ser superior la combinación de inmunoterapia adoptiva con quimioterapia, radioterapia o cirugía, que cada una por separado.

Así mismo, la inmunoterapia adoptiva mejora en ocasiones provocando una inmunoestimulación inespecífica. Así, el adenocarcinoma mamario de ratón es inhibido utilizando linfocitos sensibilizados zimosán (Martín, Hayworth y Fugman, 1970).

El desarrollo del EAC es inhibido temporalmente por células esplénicas singénicas nativas tratadas "in vitro" con inmuno-ARN, o sea, ARN de linfocitos de ratón inmunizados con EAC (Rigley, 1969), con DEAE-dextrano para facilitar su captación.

La mayor parte de los adenocarcinomas del ratón son de origen vírico. Por este motivo, poseen antígenos víricos de dos clases; unos, viro-informados, que dependen del código genético

vírico y producen proteínas de la partícula vírica; y otros, viro-inducidos, que corresponden a antígenos que no son de las partículas víricas, sino que son producidos por acción sobre diversos genes celulares (Vaage, 1968).

Algunos de los TAA no provocan reacciones de rechazo. Pero existen también TAA que pueden inhibir al neoplasma (TATA, por "tumor-associated transplantation antigens" o TARA, por "tumour-associated rejection antigens"). En condiciones experimentales, los extractos de adenocarcinoma mamario contienen TARA que son capaces de detener el crecimiento neoplásico en ratones singénicos, así como de eliminar la transmisión vertical de carcinomas mamarios inducidos por el MMTV en los ratones de la cepa C3H (Irie e Irie, 1971).

Uno de los grandes problemas de los tumores malignos es la gran heterogenicidad fenotípica en general e inmunológica en particular de sus poblaciones celulares. Hay tejidos neoplásicos que son más o menos inmunogénicos tomados en conjunto; en efecto, hay neoplasmas muy inmunogénicos y los hay escasamente inmunogénicos, porque contienen muy pocos TATA o TARA, aunque pueden poseer abundantes TAA que no actúan como inmunogénicos para destruir al tejido neoplásico.

También se da el caso de existencia de TARA que no actúan como inmunogénicos debido a que se encuentran funcionalmente bloqueados por otras moléculas.

En los ratones de la cepa A existe el adenocarcinoma mamario TA3, del cual hay dos variantes. Una de ellas, llamada

TA3/SD, crece únicamente en ratones singénicos de la cepa A, pero no en ratones alogénicos C3H. La otra variante, TA3/Ha, puede crecer tanto en animales A singénicos como en ratones C3H alogénicos.

El tumor TA3/Ha desprende abundantes TAA de la membrana celular.

Si los tumores TA3/Ha se tratan con neuraminidasa y se trasplantan, resultan rechazados por los ratones C3H (Sanford, 1967). La neuraminidasa, sobre todo la producida por el *Vibrium cholerae*, hace accesibles a los TAA que se encuentran bloqueados. Se trata de una N-acetilneuraminato-glucohidrolasa que elimina residuos de ácidos siálicos (ácido α -N-acetilneuramínico), derivados acetilados del ácido D-neurónico, que forman parte de la cadena β -galactosil de las glucoproteínas e la superficie celular.

Por otra parte, la neuraminidasa hace a las células más susceptibles a los anticuerpos 19 S (Sanford, 1973). La lisis de las células cancerosas por anticuerpos es generalmente anticuerpo-dependiente.

Independientemente de todo ello, un mismo tejidos canceroso puede contener subpoblaciones con distinta potencia inmunogénica. Las de mayor actividad inmunogénica pueden provocar la destrucción de su subpoblación, a pesar de lo cual la masa neoplásica continúa creciendo a partir de las subpoblaciones inmunogénicamente más débiles o que tienen TAA que no son TATA. Además, existen otros mecanismos de

inmunomodulación con selección en subpoblaciones inmuno-insensibles o con producción de metástasis, que en general son escasamente inmunogénicas (Vaage, 1973).

Khoda y col (1986) solubilizaron con n-butanol los TATA de células de gliosarcoma de rata (T-9). La viabilidad de las células T-9 después de eliminar los TATA por la solubilización fue demás de 85 %. Ratas sanas Fischer fueron tratadas con 500 μ g de extracto de n-butanol e inoculadas con 2 millones de células T-9. A las 8 semanas de la inoculación, el diámetro del tumor fue significativamente menor que en las ratas controles no tratadas. Otro grupo de ratas fue tratado con 770 μ g de extracto de n-butanol y las células T-9; a continuación, las ratas fueron inoculadas con 10 millones de células singénicas FTL-13 de linfoma tímico. Las células T-9 fueron rechazadas en la rata, en tanto que las células FTL-13 provocaron la muerte del huésped, lo que indica que el extracto de células T-9 con n-butanol contiene TATA específicos de las células T-9. El extracto de n-butanol se caracterizó mediante cromatografía en columna de filtración con gel TSK G-3000 SW y columna de intercambio con anión Mono Q con el sistema cromatográfico rápido de proteínas líquidas (FPLC). El TATA de las células T-9 tiene un Pm de unos 40.000-70.000 D y fue elidido en la fracción 0,6-0,9 M NaCl de la columna Mono Q. Los mecanismos de rechazo de las células T-9 en ratas tratadas con extracto de n-butanol fueron examinados.

En la rata, los tumores primitivos contienen

glucoproteínas de superficie de gran capacidad inmunogénica, en tanto que las metástasis cancerosas son muy poco inmunogénica (Kim y col, 1975).

En los procesos cancerosos existen diversos procesos de inmunomodulación, por los cuales los tumores escapan del ataque inmunológico del organismo. En la "Discusión" hablaremos del que consiste en liberación TAA solubles.

Por si ello fuera poco, las células cancerosas producen sustancias estimulantes. Las células del carcinoma mamario de ratón cultivadas "in vitro" segregan una sustancia que estimula la síntesis de ADN y la mitosis de las células normales de embrión de ratón cuando se añade su medio de cultivo a monocapas confluentes estacionarias por los fenómenos de inhibición por contacto del movimiento y de la reproducción (Nair y DeOme, 1973).

Por otra parte, no todas las reacciones inmunológicas provocadas por los tumores son inhibitorias o destructoras. La inmunoestimulación tumoral es un hecho conocido, aunque quedan muchos puntos por aclarar, que ha sido estudiada por diversos investigadores, como Prehn (1972, 1974), Medina y Heppner (1973), Fidler (1973), Shearer, Philpott y Parker (1973), Andrews (1974) y Jeejeebhoy (1974). Gracias a este proceso, se producen inmunoglobulinas inducidas por tumores y linfocitos sensibilizados que son capaces de estimular la reproducción celular neoplásica.

La timectomía, que es causa de la desaparición de las

respuestas inmunológicas mediadas por linfocitos T, aumenta generalmente la incidencia tumoral frente a los agentes cancerígenos. Así, la timectomía permite el incremento de neoplasma provocado con diversos agentes químicos, como los tumores de piel por 2,3-benzopireno (Miller, Grant y Roc, 1963) y virus, como los tumores de ratones BALB/c y C3H/HeN producidos por adenovirus 12 (Kirchstein, Rabson y Peters, 1963) o los causados en el hámster con el mismo virus (Yohn y col, 1965).

Sin embargo, la timectomía no ocasiona ningún aumento del adenocarcinoma mamario del ratón, como han observado Sakakura y Nishizuka (1967) y Yunis y col (1969). Contrariamente, la timectomía conduce a una disminución de los adenocarcinomas mamarios en los ratones de la cepa C3H, debido a que en esta cepa no se producen anticuerpos acrecentadores, actuando sólo como inhibidores.

Si se cortan fragmentos de adenocarcinoma mamario C3H y se conjuntan con gamma-globulinas humanas por medio de bisdiazobenzidina, y se inyecta el complejo junto con coadyuvante de Freund completo a ratones C3H que tienen tumores de mama, se produce degeneración y fibrosis tumoral con infiltración linfocitaria y fibrosis, y en el suero sanguíneo se detectan anticuerpos anti-tumorales (Czajkowski y col, 1966).

En la defensa inmunológica contra el cáncer participan de una u otra manera la médula ósea, el timo, los ganglios

linfáticos y el bazo. En la especie humana los ganglios son importantes, pero en los animales el bazo es más importante para la defensa inmunológica contra el cáncer que los ganglios linfáticos (Humphrey y col , 1971).

Aoyama y col (1987) observaron que la cepa de ratones II-TES libera gran cantidad de MMTV en la leche, a pesar de lo cual es resistente al desarrollo de carcinoma mamario. La observación de cáncer de mama en ratones híbridos de distintas razas reveló los siguientes resultados de los cruces de diferentes razas de ratones:

II-TES x II-TES	ningún tumor
(BABL/ca x II-TES)F1	elevada incidencia de tumor
(C57BL/6N x II-TES)F1	elevada incidencia de tumor
(BALB/ca x OZ-F)F1	ningún tumor
[(OX-F x (OZ-F x II-TES)]F1 ...	68 % de incidencia de tumor
[II-TES x (OZ-F x II-TES)]F1 ..	45 % de incidencia de tumor

La explicación es la siguiente.

La cepa II-TES posee un gen recesivo de resistencia al cáncer de mama, que impide la actividad cancerígena del MMTV pero no su liberación. El MMTV actúa con el cruce de II-TES con cepas de escasa o nula incidencia tumoral, como BALB/ca y OZ-F.

La cepa II-TES, sin embargo, posee dos genes dominantes independientes que son promotores de la carcinogénesis mamaria. En la cepa II-TES, el gen recesivo de resistencia al carcinoma mamario inhibe a los genes dominantes promotores de la

carcinogénesis mamaria. En el cruce con razas sin cáncer mamario existe un solo alelo del gen recesivo, por lo que los promotores pueden actuar.

Dux y Demant (1987) observaron que la susceptibilidad al MMTV en los ratones C3H está controlada por el MHC y que la susceptibilidad tiene lugar no sólo en el tejido mamario sino que depende de factores sistémicos.

La diferente susceptibilidad a la acción cancerígena del MMTV en los ratones C3H/Bi según su edad, muy alta entre los 5 y los 9 meses (95 %) y muy baja entre los 10 y los 12 meses (4 %), y el estudio de las reacciones inmunológicas de las células esplénicas de los ratones a distintas edades, hace pensar que unas células K no-T son las más activas, como se ve por el aumento de la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente (ADCC), participantes de la resistencia al cáncer mamario, en tanto que no parecen participar de manera importante. Una elevada respuesta blastogénica de los linfocitos esplénicos a la fitohemaglutinina (PHA) es compatible con gran incidencia tumoral. La producción de anticuerpos T-dependientes contra hematíes de carnero (SRBC) no se correlaciona con mayor o menor resistencia a la carcinogénesis mamaria. La cantidad de células T supresoras y citotóxicas cuya reacción con anticuerpos monoclonales es Lyt 1⁻2⁺, tampoco procura resistencia al desarrollo tumoral (Benvist y col).

II.G.2. INMUNOLOGIA DEL CANCER MAMARIO HUMANO

Existen muchos datos que permiten afirmar la existencia de TAA en el carcinoma de mama humano y murino, algunos de los cuales tienen relación con proteínas víricas.

El organismo reacciona frente a los antígenos tumorales. El estudio de la inmunocompetencia en las enfermas de cáncer de mama se ha hecho: a) con pruebas de hipersensibilidad retardada cutánea frente a antígenos de recordación (Solowey y Rappaport, 1965; Roberts y Williams, 1968; Al-Sarraf y col, 1970; Summer, Edwards y Baum, 1972; Nemoto y col, 1974) frente a DNBC o con extractos enriquecidos en membranas de células cancerosas; b) observando la respuesta linfoblástica de los linfocitos de las pacientes frente mitógenos inespecíficos, como la PHA (Garrioch, Good y Gatti, 1970; Roberts, 1971; Fisher, Saffer y Fisher, 1972; c) mediante análisis de la citotoxicidad de los linfocitos de las pacientes; ch) la cantidad de rosetas de linfocitos circulantes (de tipo T) que se forman espontáneamente; (Stiernswärd y col, 1972; Papatestas y Kark, 1974); d) por la prueba de la inhibición de la migración linfocitaria frente a antígenos neoplásicos solubles o pruebas de la inhibición de la adherencia leucocitaria (Moulton y col, 1974; Grosser y Thomason, 1975); e) por la prueba de "ventana cutánea".

La reactividad de las pacientes contra algunos antígenos se mantiene durante mucho tiempo, hasta que disminuye

notablemente en el cáncer de mama diseminado. Su ausencia revela un estado avanzado muy incompetente desde el punto de vista inmunológico, pero esa reactividad no se correlaciona siempre con el pronóstico.

La respuesta a la sensibilización con DNBC va disminuyendo conforme el tumor progresa. Las reacciones muy intensas tienen cierta relación con un pronóstico más favorable, disminuyendo en los carcinomas mamarios diseminados. Las pruebas inmunológicas no tienen una interpretación fácil y unívoca. En muchos tumores cerebrales, tanto malignos como benignos, desaparece la reacción de sensibilización al DNBC (Brooks y col, 1972) al parecer debido a la producción de un factor inmunosupresor humoral.

En el cáncer mamario se ha utilizado: a) la inmunoterapia inespecífica con BCG sólo o con células cancerosas autólogas activas irradiadas o tratadas con neuraminidasa (McCredie, Brown y Cole, 1959; b) la inmunización activa específica con células autólogas de cáncer mamario (Gorodilova, Silino y Soraeva, 1965; c) la inmunización con células tumorales a las que se fijó γ -globulina de conejos y adyuvante de Freund (Ezajkowski y col, 1967); ch) con antígenos de células de cáncer mamario aisladas cromatográficamente (DeCarvalho, 1964); d) la inmunoterapia activa específica con células cancerosas nativas irradiadas con rayos X o tratadas con neuraminidasa; e) la inmunoterapia adoptiva con factor de transferencia dializable (Oettgen y col, 1974); f) la inmunoterapia pasiva

con inmunosuero de caballo contra antígenos de cáncer mamario (Murray, 1958); g) el autoinjerto de tejido canceroso irradiado (Anderson y col, 1973 y 1974), que mejora los resultados de la radiosensibilidad del tumor residual.

Los resultados son mejores con tejido neoplásico autólogo que con heterólogo. No obstante, existen reacciones cruzadas entre algunos antígenos de tumores alogénicos.

Se ha preparado una línea celular de cáncer mamario humano infectado con un mixovirus aviar, con la idea de que las yemas de formación vírica en la superficie celular aumenten la capacidad inmunogénica de los antígenos tumorales (Santer, Bächl y Lindenmann, 1975). El BCG intratumoral no produce respuesta más que en el 15 % de los cánceres de mama metastásicos (Garas y col, 1975). La mejor forma de administrar el BCG es por escarificación entre los ciclos de quimioterapia, lo que consigue aumentar ligeramente la supervivencia que con sólo quimioterapia. Otros estudios señalan que el BCG no añade ninguna ventaja a la ciclofosfamida o a la adrenalectomía (Nemoto, Rosner y Dao, 1976).

La inmunoterapia inespecífica con *Corynebacterium parvum* no produce ningún efecto que mejore a la quimioterapia.

La blastogénesis de linfocitos periféricos suele disminuir, pero no pocas veces es normal en las fases iniciales para bajar cuando el tumor avanza. La linfoblastogénesis promovida por mitógenos inespecíficos indica que los linfocitos pueden reproducirse, pero no siempre se correlaciona con su

capacidad inmunogénica frente a antígenos tumorales (mitógenos específicos). No obstante, se ha señalado que cuando los ganglios linfáticos regionales contienen abundantes linfocitos, con predominio de los linfocitos T, y éstos muestran una respuesta linfoblástica abundante "in vitro" a la PHA, el pronóstico es favorable, con un aumento significativo de pacientes que sobreviven a los cinco años. En cambio, el pronóstico es desfavorable cuando los ganglios tienen pocos linfocitos y éstos no responden a la PHA.

Parece, por lo tanto, que cabe una interpretación distinta para la linfoblastogénesis de los linfocitos circulantes y de los linfocitos ganglionares.

Por otra parte, el grado de infiltración linfocitaria tumoral no se correlaciona con el pronóstico ni con la capacidad blastogénica de los linfocitos periféricos o ganglionares frente a la PHA.

El número de rosetas T disminuye generalmente en las pacientes, pero con frecuencia es normal. Su presencia no señala un pronóstico favorable.

Los extractos tumorales hacen que se pierda la capacidad de adherencia de los leucocitos a las paredes de los frascos de cultivo; el suero de las pacientes bloquea el efecto y consigue que los leucocitos permanezcan adheridos. La reacción es positiva en 89 % de las pacientes y en 6 % de los controles. La reacción es más débil en los carcinomas metastásicos que en los locales o loco-regionales.

Los extractos de membrana plasmática de células de carcinoma mamario de origen autólogo o alogénico provocan reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada en enfermas con cáncer de mama (Alford, Hollinshead y Herbeman, 1973; Hollinshead y col, 1974), atribuidas a un TAA membránico.

Los linfocitos de enfermas con carcinoma de mama cocultivadas "in vitro" con células de carcinoma de mama, provocan su apelmazamiento (Sherwin y Richters, 1972) y manifiestan claras reacciones de tipo inmunológico (Fossati y col, 1972).

Utilizando la técnica de migración leucocitaria con extractos tumorales mamaros se ha demostrado la presencia de TAA (Andersen y col, 1970; McCoy y col, 1974; Cochran y col, 1974) y Perlin y col (1975) señalaron la existencia de TAA comunes en los carcinomas mamaros masculinos y femeninos. La prueba de inhibición de la migración leucocitaria disminuye de intensidad con los extractos de tejido de carcinoma mamario autólogo (Anderson y col, 1970). En general, los extractos de diversos tumores inhiben la migración de leucocitos autólogos y alogénicos (Wolberg, 1971).

En cáncer de mama humano, la irradiación local postoperatoria inhibe notablemente la inmunidad mediada por células (Cosimi y col, 1973). La irradiación pre- o postoperatoria inhibe la inmunidad celular (Glas y Wasserman, 1974).

Así mismo, la irradiación inhibe la producción de

linfocitos T y B, pero los linfocitos B, mediadores de la inmunidad humoral, se recuperan primero (Wood y col, 1974).

Se ha indicado la existencia de una correlación entre el grado de inmunidad celular apreciada por medio de pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada y el pronóstico de diversos tipos de cáncer, como se ha señalado para cánceres ginecológicos (Nalick y col, 1974) y broncopulmonares (Han y Takita, 1972; Anthony y col, 1974); también se correlaciona con la extensión tumoral (Eilber, Nizze y Morton, 1975). No obstante, son numerosas las excepciones.

En el cáncer mamario humano, la reacción positiva a la tuberculina intracutánea se ha asociado por Mackay y col (1971) a un pronóstico más favorable. Dicha reacción se toma como manifestación de mejores defensas inmunológicas y depende de la secreción de cortisol y andrógenos.

Nemoto y col (1974) encontraron en pacientes con cáncer de mama una correlación entre la respuesta blastogénica de los linfocitos "in vitro" estimulados por mitógenos inespecíficos como la PHA y la inmunidad mediada por linfocitos. La blastogénesis linfocitaria es inhibida "in vitro" por los extractos de carcinoma de mama (Fischer y col, 1969; Savel, 1969. La citotoxicidad de los linfocitos disminuye en las enfermas de cáncer mamario (Deodhar, Crile y Esselstyn, 1972; Fossati, Conevari y Della Porta, 1972). La prueba de la inhibición de la migración linfocitaria disminuye de intensidad con extractos de tejido de carcinoma de mama autólogo

(Anderesen y col, 1970). Los extractos neoplásicos inhiben la migración de leucocitos autólogos y alogénicos (Wolberg 1971).

Campbell y col (1986) estudiaron la respuesta humoral autóloga y alogénica en pacientes con cáncer de mama frente tumores de mama mediante la aplicación de ELISA en suero y sobrenadantes de linfocitos transformados de las pacientes y de controles. En el grupo control puesto en contacto con suero con anticuerpos, se observó que no había respuesta ni aumento relativo del título. Sin embargo, cuando se analizó la respuesta por el uso de clones de linfocitos transformados de las pacientes, se demostró una especificidad generalizada que contribuía al encubrimiento de la respuesta específica en el suero. Algunos de estos clones podrían tener aplicación en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama.

Sjögren y col (1972) descubrieron que el suero sanguíneo de los enfermos de cáncer contenía factores bloqueantes de la citotoxicidad linfocitaria. Los factores bloqueantes séricos se fijan a las células cancerosas, de donde pueden ser eluidos, habiéndose demostrado que se trata de los comúnmente llamados inmunocomplejos (IC), complejos antígeno-anticuerpo.

Los factores bloqueantes, IC circulantes (ICC), además de inutilizar a los anticuerpos, se fijan a los linfocitos impidiendo su actividad citotóxica. También se unen a la membrana celular favoreciendo su inmunomodulación.

Los de pacientes con carcinoma mamario inhiben la blastogénesis linfocitaria inducida por el PHA (Whitaker, Reesk

y Clark, 1971).

Para complicar más la situación, el suero sanguíneo de pacientes con cáncer mamario contiene factores inhibidores de los IC (Hellström y col, 1971; Hellström y Warner, 1973). Estos factores existen también en mujeres normales, aunque tienen un 40 % de la actividad de los encontrados en las pacientes.

Aunque sea más corriente que los cánceres avanzados manifiesten reacciones de hipersensibilidad retardada negativas o ligeramente positivas, como se ha descrito en cánceres del aparato digestivo (Kronman, Shapiro y Localio, 1972) entre otros, se ha demostrado que una buena respuesta blastogénica no lleva siempre aparejada una mejor defensa antitumoral, y se sabe que hay cánceres diseminados de diversos tipos que presentan reacciones de hipersensibilidad retardada normales para antígenos previos (Primack, Vogel y Barker, 1973), y respuesta blastogénica normal a la PHA en organismos que son incapaces de desarrollar poblaciones linfocitarias competentes frente antígenos nuevos o contra los antígenos del tumor que hospedan.

Los extractos de antígenos de membranas celulares de carcinoma mamario humano obtenidos con solución de cloruro de potasio 3 M y con otros medios reaccionan "in vitro" con anticuerpos y linfocitos de pacientes con carcinoma mamario (Gentile y Flickinger, 1972; Story y col, 1974). Estos extractos de tejido de carcinoma mamario autólogo o alogénica aumentan la inhibición de la migración de los leucocitos de las

enfermas en el 77 % de los casos (McCoy y col, 1974; Perlin y col, 1975). Los extractos similares obtenidos de tejidos mamario normal o de mastopatías benignas no manifiestan tal efecto. Igualmente, estos antígenos indican la existencia de antígenos anormales del complejo mayor de histocompatibilidad.

Black y col (1975) mostraron que la leche de ratonas que contienen MMTV, así como los antígenos de tumores malignos y benignos murinos no modifican la migración de los leucocitos de las mujeres sanas o con tumores benignos. En cambio, inhiben a los leucocitos de mujeres con carcinoma mamario en el 31 % de los casos, lo que demuestra la existencia de anticuerpos antineoplásicos de mama humanos que reaccionan con antígenos de cáncer mamario murino o de MMTV. La mayor reacción se lleva a cabo con los antígenos de las partículas intracitoplásmicas de tipo A (Müller y col, 1973).

Black y col (1975) describieron que la presencia de antígenos inmunogénicos de carcinoma mamario humano que son similares al MMTV es un dato diagnóstico favorable.

En los sueros de las pacientes de cáncer de mama aumenta la cantidad de anticuerpos antitumorales en las primeras fases del crecimiento neoplásico, pero disminuyen y llegan a desaparecer en los tumores muy grandes. Así mismo, cuando un tumor mamario es extirpado, aumenta temporalmente el título de anticuerpos.

En el cáncer mamario con metástasis tratado mediante mastectomía, el intervalo libre de enfermedad y la

supervivencia son mayores cuando se detectan anticuerpos anticancerosos circulantes. Los ganglios linfáticos regionales no invadidos o con una discreta invasión de células cancerosas contienen linfocitos citotóxicos para dichas células; en cambio, los ganglios con grandes metástasis carecen de linfocitos citotóxicos (Deodhar, Crile y Esselstyn, 1972).

Es curioso que los linfocitos citotóxicos de ganglios linfáticos regionales de carcinomas mamarios reaccionen con las células de melanomas malignos y viceversa; esta reacción cruzada se observa en el 25 % de los casos. A su vez, los linfocitos de ganglios linfáticos regionales tanto de carcinoma mamario como de melanoma maligno son citotóxicos para células embrionarias humanas en el 66 % de los casos (Della Porta, Canervari y Fossati, 1973).

Empleando anticuerpos mononucleares contra monocitos humanos, Calvo y col (1987) encontraron en las 7 líneas celulares examinadas antígenos My4, MO1 y MOF11. En algunos casos se encontró expresión de antígenos Leu M1, Leu M3, My9 y MO2. Hubo nada o muy pocos antígenos Leu M2 y My7. En conjunto se encontró expresión de antígenos mielo-monocíticos en tejidos de carcinoma de mama primitivo, metástasis de carcinoma mamario, fibroadenoma mamario, glándula mamaria normal y células mieloides. Hay expresión común de algunos antígenos en las células epiteliales mamarias normales o tumorales y en las células mielo-monocíticas, posiblemente porque son proteínas implicadas en funciones similares de interacción con la matriz

extracelular y preceden a la migración en el caso de los macrófagos y las células cancerosas epiteliales. No se encontraron antígenos de linfocitos T o B en las células de carcinoma mamario.

Byers y col (1975) encontraron que los linfocitos de pacientes tratadas, durante el intervalo libre de enfermedad, eran citotóxicos para la línea celular ALAb-496, obtenida de carcinoma mamario. También había linfocitos citotóxicos anti-ALAb-496 en algunos sujetos sanos, tanto hombres como mujeres, particularmente en personas en íntimo contacto con enfermas de cáncer de mama.

En los casos de cáncer mamario con invasión de los ganglios axilares, cuando la tasa de anticuerpos es extremadamente baja o nula la supervivencia media es de doce meses; si existen anticuerpos, la supervivencia es mayor de dos años.

Cuando se estudian los linfocitos de los ganglios linfáticos axilares de enfermas con cáncer de mama, se observa que los linfocitos de los ganglios con invasión neoplásica reaccionan al efecto mitógeno de la PHA con menor intensidad que los linfocitos de los ganglios no invadidos (Fisher, Saffer y Fisher, 1972). Sin embargo, esto no se repite para tumores de colon y otras localizaciones.

Nalick y col (1974) encontraron que la reacción adecuada de los ganglios linfáticos regionales de la mama en el caso de carcinoma de la misma revela un mejor pronóstico. Cuando los

ganglios muestran abundantes linfocitos y un predominio de los linfocitos T, con respuesta linfoblástica abundante "in vitro", el número de pacientes que sobreviven a los cinco años es significativamente mayor que cuando se encuentran ganglios con escaso número de linfocitos. Pero en estas mismas pacientes, la cantidad de linfocitos T y B circulantes y la respuesta blastogénica linfocitaria al mitógeno inespecífico PHA son similares a las enfermas con tumores benignos y a las mujeres sanas.

Existen muchas discusiones sobre el papel de los ganglios linfáticos en el cáncer, sobre si son o no útiles como centros defensivos.

En el carcinoma mamario, el número de ganglios regionales axilares afectados se correlaciona con el pronóstico (Black y Asire, 1969; Silverberg y col, 1970; DiPaola y col, 1973; Friedell y col, 1974). Cuando la invasión de los ganglios linfáticos axilares con células cancerosas es muy marcada, se ven imposibilitados para detenerlas y se produce la diseminación. No obstante, se supone que durante cierto tiempo los ganglios linfáticos impiden la diseminación cancerosa (Edwards, Baum y Magarey, 1972; Berg y col, 1973). La defensa ganglionar se debe a la llegada de antígenos liberados por el tumor; los ganglios linfáticos responden a los antígenos cancerosos con aumento de la actividad de las células reticulares e histiocitosis de los senos vasculares.

De estos hechos surgió la duda de si los ganglios

regionales deben o no eliminarse sistemáticamente con cirugía e irradiación.

Desgraciadamente, para conocer el estado de los ganglios linfáticos hay que quitarlos y estudiarlos por microscopio. Además, estando el tratamiento y pronóstico del cáncer de mama relacionado con el número de ganglios afectados, se deben extirpar y examinar muchos de ellos, quizá cuando menos seis de los sospechosos. Con frecuencia los ganglios reactivos pero no invadidos están agrandados. Su extirpación para comprobar que no son neoplásicos resta capacidad defensiva. Los ganglios reactivos vuelven a la normalidad unos tres meses después de una mastectomía simple sin vaciado axilar.

En los tumores pequeños, una infiltración abundante de linfocitos se ha asociado a mayor supervivencia o, cuando menos, a una fase de frenado de la extensión de la invasión neoplásica. Pero cuando el tumor alcanza tres o cuatro centímetros de diámetro y hay ganglios regionales invadidos, la presencia de gran infiltración linfocitaria tumoral corresponde a peor pronóstico (Flores y col. 1974).

En los ganglios linfáticos regionales no invadido por células neoplásicas existen linfocitos productores de inmunoglobulinas M (IgM). Cuando son invadidos, desaparecen los linfocitos productores de IgM, en coincidencia con la desaparición de las IgM en el tejido tumoral (Richter y Kasperskey, 1975).

En la primera fase del crecimiento del carcinoma mamario,

el análisis del tejido tumoral muestra disminución de la cantidad de IgA e IgG en la tercera parte de los casos y aumento de IgM (Roberts y col. 1973). La cantidad total de inmunoglobulinas se correlaciona con el número de células plasmáticas que infiltran el tumor. Parece ser que las IgA aumentan durante la carcinogénesis y se encuentra con frecuencia elevada en el suero sanguíneo de las pacientes (Rowinska, Lazar y Burtin, 1970). Algunos investigadores les atribuyen actividad promotora. Esto no compagina con la observación de que en las mujeres con cáncer mamario que son mastectomizadas e irradiadas, el pronóstico es mejor cuando antes del tratamiento tienen una concentración alta de IgA que cuando es baja (Meyer, MacKler y Beck, 1973). El aumento de las IgM corresponde a una reacción inmunológica defensiva.

También en el suero sanguíneo de las enfermas es frecuente encontrar aumentada la IgA). No se ha observado un incremento de IgA en los tumores benignos. Se ha hallado también un aumento de las α 2-globulinas en el suero de enfermas con carcinoma mamario metastásico (Minton y Bianco, 1974).

Della Porta, Canevari y Fossati (1973) indicaron que el suero de las pacientes con carcinoma mamario contiene anticuerpos anticancerosos específicos en el 58 % de los casos antes del tratamiento quirúrgico y en el 33 % seis meses después de la mastectomía.

Odili y Taylor (1971) observaron que el núcleo de las células de carcinoma mamario humano contienen un antígeno

detectado mediante fijación del complemento con sueros sanguíneos autólogos o alogénicos. En los sueros de las pacientes aumenta la cantidad de anticuerpos en las primeras fases de crecimiento tumoral, para disminuir y hasta desaparecer en los tumores muy grandes. Los títulos de anticuerpos aumentan temporalmente de manera significativa cuando el tumor es extirpado.

Humphrey y col (1974) y Estes y col (1974), usando pruebas de fijación de complemento e inmunodifusión, encontraron que el suero de pacientes contenía anticuerpos contra antígenos de extractos de carcinoma mamario en el 46 % de los casos. No obstante, carecían de especificidad, ya que se veían en el 34 % de los casos de enfermedad fibroquística y en el 25 % de los fibroadenomas de la mama.

La cantidad de anticuerpos fijadores de complemento que reaccionan contra antígenos solubilizados de carcinoma mamario, la infiltración linfocitaria del tejido tumoral, la reacción linforreticular, la histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos regionales y la inhibición de la migración leucocitaria, se correlacionan con el pronóstico del carcinoma mamario (Hudson y col, 1974).

Chaitchik y col (1987) estudiaron 91 casos de cáncer de mama en estadio I hasta 14 años después de la mastectomía. La supervivencia a los 10 años era del 65 %. existe una ligera tendencia a mejor supervivencia, pero de escasa significación cuando hay infiltración linfocitaria perivenosa, infiltración

linfocitaria tumoral difusa o histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos no invadidos; tampoco hay grandes variaciones con el tipo histológico, diferenciación nuclear, edad y raza con la situación medial o lateral.

Los antígenos del carcinoma mamario reaccionan con el fragmento Fab de la sinmunoglobulinas, no con el Fc.

El uso de la fracción citoplásmica tumoral como complejo antigénico inyectado intracutáneamente muestra que las reacciones de hipersensibilidad retardada positivas corresponden a las supervivencias más cortas (Hughes y Lytton, 1964). Esta reacción se observa en el 18 a 25 % de las mujeres.

Aunque los antígenos de la membrana celular sean los que participan en las reacciones inmunológicas, existen antígenos en otras partes de la célula. Cuando se emplea membrana de células cancerosas, con frecuencia se obtienen reacciones de hipersensibilidad retardada, que a veces se correlacionan con un pronóstico favorable y otras no. Los antígenos en juego no parecen ser específicos. Stewart y Orizaga (1971) han señalado que las enfermas de cáncer de mama pueden presentar una reacción de hipersensibilidad retardada frente a membranas de tejido de carcinoma mamario, de tejido mamario normal y de melanoma maligno, posiblemente por la presencia de antígenos comunes.

Iman y Taylor (1989) utilizaron linfocitos de ganglios linfáticos invadidos por células de carcinomas mamarios metastásicos y los hibridaron con células de una variante no

secretora de mieloma murino. Obtuvieron 14 hibridomas productores de IgG y 51 sintetizadores de IgM, todos ellos anticuerpos monoclonales (AMC). Reaccionaron en forma variable con tejidos de carcinoma mamario humano, pero también con células cancerosas de colon, estómago, pulmón y células normales del epitelio del colon y de la superficie interior de los túbulos renales.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamina se han aislado TAA del cáncer de mama que no existen en el tejido normal (Herberman, 1973; Hollinshead y col., 1974).

Abe y Kufe (1986) desarrollaron un anticuerpo monoclonal (AMC) contra membrana plasmática cruda de carcinoma de mama humano, al que se llamó AMC DF3. Este reacciona con un antígeno de superficie de gran peso molecular, unos 300 kd (DF3). El ácido butarínico aumenta la expresión del antígeno DF3, de lo que se deduce que se puede tratar de un antígeno de diferenciación presente en las células de carcinoma mamario. El AMC DF3 reacciona también con las glucoproteínas, de 330 y 430 kd, que existen en las células MCF-7 de carcinoma de mama. El contenido intracelular y la secreción del antígeno DF3 aumenta con el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato y con la 1- β -D-arabinofuranosil-citosina (ara-C). La expresión del antígeno DF3, no obstante, disminuye con diversos inductores de diferenciación, como el ácido retinoico, la hexa-metileno-bisacetamida, la 1,25-dihidroxi-vitamina D3 y algunos solventes polares. La secreción de antígeno DF3 es proporcional a su

producción. La valoración de DF3 puede orientar sobre el grado de maduración del carcinoma mamario humano.

La tenascina es un glucoproteína de la matriz extracelular que existe en el estroma del tejido de carcinoma mamario humano, o inducido en ratas con agentes químicos o provocado en ratones con virus, pero no se encuentra en el tejido mamario normal humano, de rata o ratón, ni en los tumores benignos (Mackie y col, 1987). La tenascina interviene en las interacciones entre el estroma y el epitelio mamarios neoplásicos.

Gusterson y col observaron que un anticuerpo monoclonal de ratón contra un epitopo de un polipéptido glicosilado de 100.000 daltons de las células de leucemia linfoblástica aguda, reaccionaba con las células mioepiteliales del tejido mamario normal humano y de rata. No se tiñen las células de los conductos, los vasos sanguíneos o el estroma. Las células teñidas varían entre el 3 y el 14 % de la población celular mamaria. Este anticuerpo, no específico de la glándula mamaria, podría servir en el tejido mamario para aislar células túbulo-glandulares de células mioepiteliales.

Keydar y col (1989) produjeron un anticuerpo monoclonal (H23) de ratón contra partículas de tipo vírico liberadas "in vitro" por células de la línea T47D, procedente de un adenocarcinoma mamario humano. El anticuerpo reacciona con una gp68 que es segregada al medio de cultivo y en los derrames pleurales por carcinoma mamario. La gp68 se encuentra también

en la superficie celular y el citoplasma de células de carcinoma mamario, de metástasis de carcinomas mamarios y de células de la línea T47D. En un estudio de tejidos de 812 pacientes con carcinoma de mama se encontró con la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta que el anticuerpo monoclonal H23 reaccionó en el 91 % de los casos. La gp68 no existe en tejido mamario normal y se detectó en 1 de 56 muestras de lesiones benignas de mama.

Con anticuerpos monoclonales (E476) Díaz-Chico y col (1988) han demostrado en las células MCF-7, de carcinoma mamario humano, una proteína de 65 kDa que es receptor de estrógenos y un fragmento de 46 kDa del receptor de estrógenos que es un TAA.

El tejido de carcinoma mamario en presencia de anticuerpos monoclonales III D5 contra antígenos de membrana de glóbulos grasos de leche humana reaccionó con 55 de 74 tumores (74.3 %) con un antígeno citoplásmico y unas cuantas veces con material extracelular secretado. La positividad a los Ac III D5 en citoplasma se correlaciona con los receptores estrogénicos y/o progesterónicos, y la positividad con el antígeno secretado con la existencia de receptores estrogénicos pero no de receptores progesterónicos (Krohn y Helle, 1986)._____

El anticuerpo monoclonal 323/A3 contra células MCF-7, de carcinoma mamario humano, se fijó "in vitro" a un antígeno de superficie de 4 de 6 líneas neoplásicas de mama ensayadas y a ninguna línea tumoral que no fuera de mama (Edwards y col,

1986). En estudios de tejidos tumorales, el antígeno se encontró en 6 de 8 (75 %) ganglios linfáticos con metástasis de carcinoma de mama, 76 de 128 (59 %) carcinomas primarios, 13 de 63 (20 %) lesiones benignas y 0 de 10 muestras de tejido mamario normal y de tejidos normales no mamarios, con excepción del epitelio del colon. Es positivo en algunos adenocarcinomas no mamarios. Se trata de una glucoproteína de Mr 43.000 que existe en los tejidos orgánicos y en las líneas celulares "in vitro".

El anticuerpo monoclonal DF3 contra carcinoma mamario humano, que es una glicoproteína compleja y variable, de 300 a 450 kd. Se compone de 4 fracciones con distinta movilidad electroforética: S ("slow"), I (intermedia), R (rápida) y VR ("very rapid") y la DF 3 final en suero tiene distinta movilidad electroforética según los individuos. Hay también DF3 en orina, con fracciones algo diferentes que en el plasma. Se trata de un antígeno heterogéneo, que es una expresión codominante de alelos génicos múltiples en un locus genético único (Hayes y col, 1988).

El anticuerpo monoclonal DF3, una IgG1 contra membrana de células de carcinoma mamario humano, reacciona con el epitopo de una familia de glucoproteínas de elevado peso molecular (entre 300 y 450 kD) que existe en el 78 % de las células de carcinoma mamario, 95 % de las células de carcinoma ovárico y con las células de la línea celular MCF-7 establecida "in vitro" de un carcinoma mamario humano (Hayes y col, 1988).

Kufe, Hayes y Abe (1987) y Kufe y col (1988) prepararon anticuerpos monoclonales DF3 contra membranas celulares de metástasis hepáticas de carcinoma mamario humano. El anticuerpo monoclonal DF3 reacciona con los bordes apicales de las células mamarias secretoras y con el citosol de células cancerosas menos diferenciadas. El antígeno DF3 existe en micrometástasis circulantes y de médula ósea. Ensayando el anticuerpo monoclonal DF3 y los anticuerpos monoclonales F36/22 y 115-D8, elaborados por otros investigadores contra las membranas de los glóbulos grasos de leche humana, han encontrado que todos ellos reaccionan con el mismo antígeno; DF3 y F36/22 son idénticos y reaccionan con el mismo epitopo, en tanto que 115-D8 lo hace con un segundo epitopo. El DF3 circulante está formado por una familia de glucoproteínas periacinosas con un peso molecular entre 300.000 y 450.000 D. El antígeno DF3 está aumentado en el 72 % de las enfermas con carcinoma mamario metastásico y su concentración se correlaciona con la evolución clínica. El uso conjunto de anticuerpos Mc DF3 y 115-D8 reveló la existencia de un antígeno que llamaron CA15-3, que existe en 115 de 158 pacientes con carcinoma mamario metastásico y su concentración se correlaciona con la evolución. Los autores consideran que la determinación del antígeno CA15-3 es más sensible que el CEA.

El TAA CA15-3 del carcinoma mamario es reconocido por los anticuerpos monoclonales 115 D8 y DF3, hecho analizado por Fujino y col (1986). En el suero normal los niveles son de 24 U/ml (media de 462 individuos). Este valor está aumentado en el

24,3 % de las enfermas con carcinoma mamario de todos los estadios; se correlaciona con el estadio clínico haciéndose positivo en el 64,7 % de los casos en estadio IV, 70,3 % de tumores metastásicos y 52,4 % de tumores recurrentes. El porcentaje de positividad de CA15-3 en suero es similar al de CEA en los casos de carcinoma mamario, pero hay menos casos positivos de CA15-3 que de CEA en lesiones mamarias benignas, cirrosis hepática y cánceres no mamarios. Esto revela que el CA15-3 es útil en el diagnóstico y seguimiento de carcinoma mamario.

Iacobelli y col (1986) prepararon anticuerpos monoclonales inmunizando ratones con proteínas liberadas al medio de cultivo de células de carcinoma mamario humano mantenidas "in vitro". El anticuerpo monoclonal SP-2, un antígeno de Mr 90.000 de tipo proteínolipídico, reaccionó con 81 de 90 muestras tisulares de carcinoma mamario humano (90 %), con 12 de 23 cánceres no mamarios (52 %) y fue negativo con los tejidos normales. Valorado en suero, 35 de 69 pacientes con carcinoma mamario (50,7 %) y 11 de 37 pacientes con lesiones benignas de mama (29,7 %), tenían más de 6 U/ml; también estaba elevado en el 32 % de casos de cánceres no mamarios. Aunque de peso molecular similar al CEA, se trata de un antígeno diferente que podría utilizarse como marcador biológico de patología mamaria.

Alberti y col (1986) estudiaron tejidos de cistosarcoma filoides; se encontraron receptores estrogénicos en 4 de los 15 casos, con un promedio de 22 fmol/mg de proteína. CEA existía

solamente en los componentes epiteliales de 12 de los 15 tumores. Se observó correlación entre expresión de CEA y recidiva tumoral (50 %); no hubo recurrencia en los CEA-negativos. No hay correlación entre la expresión de CEA y receptores estrogénicos.

Bhatavdekar y col (1990) estudiaron 144 pacientes con cáncer de mama avanzado, 64 premenopáusicas y 80 postmenopáusicas y sus respectivos controles y observaron una relación directa entre los niveles plasmáticos de PRL y la progresión tumoral o no respuesta al tratamiento.

Los interferones (IFN) modulan la expresión de diversos antígenos de la superficie celular, entre ellos los del MHC. Boyer y col (1989) estudiaron la acción de $rIFN\alpha$ y $IFN\gamma$ sobre la expresión de antígenos MHC y otros que no son MHC. Usan anticuerpos monoclonales para 14 antígenos de superficie de las células cancerosas de 5 líneas celulares de carcinoma mamario o 5 de cáncer ovárico. El $rIFN\gamma$ aumenta los antígenos de MHC de clase I y de clase II en el 90 % de los casos, hasta 11 veces. El estudio de 17 epítomos de antígenos que no son MHC mostró un aumento en el 6 % de los casos que no pasa de 2,7 veces. En 6 líneas celulares no aumentaron en ningún caso y en 4, uno o dos epítomos moderadamente. Los interferones, por tanto, producen la inducción selectiva de antígeno del MHC y, en menor cuantía, de unos cuantos TAA que no son del MHC.

De la revisión anterior se desprende el evidente interés que ha suscitado el estudio de distintos aspectos inmunológicos

en el cáncer de mama. A pesar de que existen numerosos hallazgos intrínsecamente importantes, se observan muchos resultados contradictorios, se recogen situaciones dispares en diferentes modelos experimentales y es muy difícil encontrar un común denominador.

Por otra parte, muy pocos de los descubrimientos mencionados pueden ser extrapolados a las observaciones clínicas.

III. MATERIAL Y METODOS

III.A. MUJERES

Para la realización de este trabajo se estudiaron 44 mujeres. De ellas, 18 fueron mujeres sanas no embarazadas, 7 sanas embarazadas y 19 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de la glándula mamaria.

Las edades estuvieron comprendidas entre los 23 y los 44 años.

Las edades medias fueron 31,3 años para las mujeres sanas no embarazadas, 27 años para las embarazadas y 37 años para las pacientes con cáncer de mama.

III.B. ANIMALES

III.B.1. RATONES SWISS

Se utilizaron ratones de la raza Swiss y C3H/He. El ratón de tipo "Swiss" es una raza albina que se originó del *Mus musculus* gris común. Por cruces entre los ratones albinos se obtuvo una raza bastante homogénea que se mantiene de manera endogámica respecto a raza, pero no de manera consanguínea estricta como en las llamadas cepas ínsitas o endogámicas, como es la cepa C3H descrita a continuación.

III.B.2. CEPA INSITA DE RATONES C3H/He

La cepa C3H, a la que también se ha llamado cepa Z, es el resultado del cruce entre un macho DBA y una hembra albina Bagg, hecha homocitogica, isogénica e isoantigénica por 25 cruces consanguíneos sucesivos y mantenida por consanguinidad estricta. Los ratones de esta cepa presentan una incidencia muy alta de adenocarcinomas mamarios espontáneos, tanto en hembras que crían como en vírgenes; presentan una elevada incidencia de hepatocarcinomas. Las células de la glándula mamaria de los ratones C3H contienen una gran cantidad de partículas del virus de los tumores mamarios murinos, abreviado habitualmente como MuMTV o MMTV (por "murine mammary tumor virus").

La cepa C3H/He fue obtenida por Heston sacando ratones de la cepa C3H mediante cesárea antes de su nacimiento natural y amamantándolos con ratonas de la cepa C57BL para evitar la transmisión horizontal del virus liberado en la leche de las ratonas C3H. Se observó que los ratones de esta cepa presentaban una incidencia muy baja de tumores mamarios, la cual se convierte en alta cuando los ratones son amamantados con ratonas C3H que tienen virus del tumor mamario murino (MMTV) en la leche.

No obstante, los ratones C3H/He contienen en su genoma ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del genoma de ARN vírico. Aunque muchas sublíneas de C3H/He conservan la característica de "no productivas" de partículas víricas

maduras, algunas líneas de ratones y sublíneas celulares C3H/He establecidas "in vitro", como algunas de las mantenidas en nuestro laboratorio, han recuperado la capacidad de producir virus vegetativos, por inducción de ADNc provírico.

III.B.3. CONEJOS

Utilizamos conejos de la raza "Neozelandés", con los cuales se consiguen buenos títulos de anticuerpos tras su inmunización y por su tamaño se puede conseguir mayor cantidad de suero sanguíneo.

III.C. CULTIVOS DE CELULAS "IN VITRO"

Los cultivos de células "in vitro" fueron de gran importancia para realizar este trabajo. Se hicieron cultivos primarios y cultivos de líneas celulares establecidas

Para el desarrollo adecuado de los cultivos celulares "in vitro" se debe conocer si las condiciones mantienen la máxima viabilidad celular, mediante pruebas de viabilidad, y cual es su capacidad proliferativa, por medio de curvas de crecimiento y eficiencia de planqueo. Así mismo, es indispensable comprobar que están libres de contaminación, haciendo pruebas de esterilidad.

Las técnicas de todo esto se indican a continuación.

III.C.1. TECNICA DEL CULTIVO PRIMARIO

Para los cultivos primarios se utilizaron embriones de ratón, cuyas células sirvieron como células normales control.

Con objeto de realizar un cultivo primario de embrión de ratón, la edad del mismo es importante en algunos estudios.

Para realizar un cultivo primario de embrión de ratón, la edad del mismo puede ser importante en algunos de los estudios. Dicha edad se determina de una manera bastante exacta, sobre todo en los animales homocigóticos mantenidos en condiciones idénticas, mediante curvas ponderales desde el apareamiento hasta el momento del parto. Debe tenerse en cuenta que existen variaciones dependiendo del número de embriones y del estado previo de las ratonas (vírgenes o multíparas). Los embriones que se utilizan son los de ratonas de 14-16 días de preñez.

La extracción se realiza extirpando el útero completo tras sacrificar a la ratona por fractura cervical, fijarla por las cuatro extremidades y realizar la incisión, sobre campo aséptico desde la zona superior genital hasta el tórax. Los úteros se depositan sobre placas de Petri con solución de Dulbecco [1x], los embriones, con amnios y placenta, se ponen en otra placa con solución salina equilibrada de Dulbecco [1x] (SSED) y se extraen los primeros, colocándolos en otra placa con SSED para proceder a su decapitación con tijeras. En una placa de Petri nueva, se trocean con bisturíes encarados y se pasan a un matraz de Rapaport con barra magnética, al que se

añade SSED. Tras la sedimentación de los trozos, se decanta el sobrenadante y se repite la misma operación hasta que la solución salina quede transparente.

Los fragmentos no disgregados se ponen en tripsina al 0,2 % en un agitador magnético. Se filtra sobre 6-8 capas de gasa y se añade un volumen del medio de cultivo apropiado para proceder a su centrifugación a 100 x G durante diez minutos. Se desprecia el sobrenadante y la pella se resuspende en un volumen conocido de medio. El medio de crecimiento utilizado es R5aI de McCoy suplementado con 10 % de suero de ternera. Se hace el recuento de células viables y se procede a la siembra a una concentración de 200.000-500.000 células/ml. Cuando la monocapa alcanza la confluencia se puede hacer un subcultivo secundario.

III.C.2. TECNICA DEL SUBCULTIVO DE LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS "IN VITRO"

Las células establecidas "in vitro" se mantienen poniéndolas en condiciones para proliferar con medios de crecimiento adecuados en recipientes convenientes. La colonia celular debe proliferar hasta confluir, formando un manto de células que se llama "monocapa celular" en los cultivos con las células adheridas a la superficie de los recipientes. También se pueden cultivar las células en suspensión, hasta alcanzar una densidad determinada; entonces se reparte la población en

nuevos recipientes. En ambos casos se habla de subcultivo.

En los cultivos en monocapas, el subcultivo se realiza cuando las células confluyen, pero antes de que se aprieten, para que no se produzcan alteraciones celulares por hacinamiento y desproporción entre población celular, productos catabólicos y sustancias nutritivas del medio de crecimiento. Las células de las monocapas pueden desprenderse mediante diferentes métodos, que en gran parte dependen de las características de la línea celular que se quiere subcultivar. Existe un procedimiento de desprendimiento mecánico, utilizando espátulas con extremidad de goma o de teflón; otros métodos utilizan soluciones quelantes o enzimáticas. Estas últimas suelen ser las más empleadas.

El subcultivo debe realizarse en condiciones de esterilidad. La técnica requiere experiencia para evitar contaminaciones y hacerla cuidadosamente pero lo más rápidamente posible para que las células no permanezcan mucho tiempo a temperatura ambiente o en presencia de soluciones enzimáticas o salinas capaces de dañarlas.

Para subcultivar las células se parte de un cultivo con la monocapa celular confluyente, se decanta el medio gastado y se añade solución de tripsina al 0,2 % a 37° C, balanceando suavemente de 1 a 3 minutos, según las características de la línea celular que se subcultiva.

La solución enzimática se decanta sin escurrir demasiado y se deja actuar a la tripsina que queda, incubando a 37° C

durante 5 a 10 minutos. La monocapa se retrae y empieza a desprenderse de la pared del recipiente. Se añade medio fresco a 37° C, se resuspenden las células por pipeto suavemente para desperdigarlas y se toma una muestra para recuento celular.

Se distribuye en nuevos recipientes poniendo la solución a la concentración necesaria para el crecimiento de la población celular, que varía para cada tipo de línea celular. Se completa con medio de cultivo fresco el volumen que necesita el frasco de siembra según su tamaño. Se agita suavemente la suspensión para distribuir homogéneamente las células y se incuba a 37° C.

III.C.2.a. Línea celular MMT establecida "in vitro"

Para la realización de nuestro trabajo utilizamos la línea de células MMT.

La línea celular MMT fue establecida "in vitro" por Sachs en 1962 a partir de un adenocarcinoma mamario espontáneo de ratón hembra, híbrido del cruzamiento F1(C57B1 x Af). Las células MMT presentan una morfología epiteliode, que puede verse en la figura 3. Tienen un cariotipo compuesto por dos troncos modales, uno de 40 y otro de 80 cromosomas, con un desperdigamiento entre 36 y 81 cromosomas. Originalmente, estas células producían y eliminaban al medio MMTV.

El medio de crecimiento generalmente utilizado para el cultivo estacionario en monocapa de esta línea celular es el

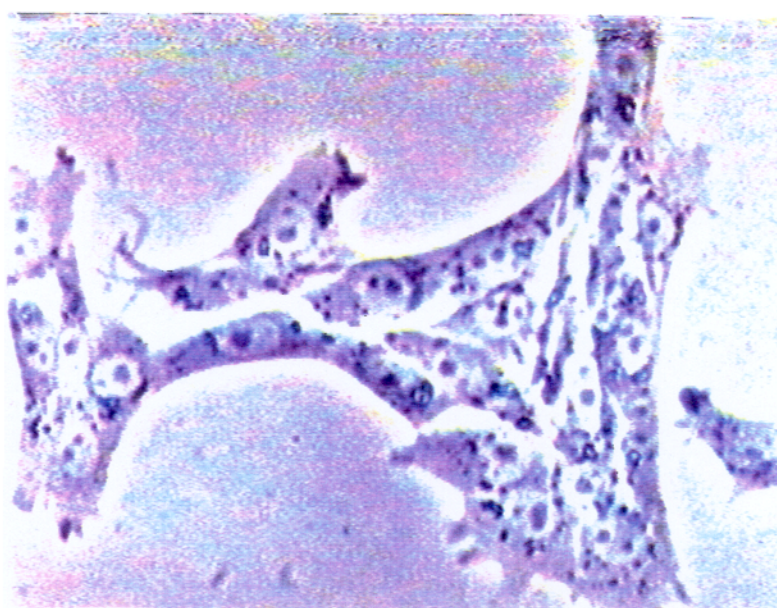


Figura 3

Células MMT vistas por contraste de fases. Aumento 190x.

medio esencial mínimo de Eagle suplementado con 10 % de medio de ternera recién nacida. Pero también progresan muy bien en medio R5aI de McCoy. Para subcultivar las células se desprenden con solución de tripsina al 0,2 %, que se deja actuar durante cinco minutos, y se siembra en proporción de 1 para 20, o sea, unas 40.000 células/cm². La monocapa llega a la confluencia a los seis días. El cambio de medio se realiza diariamente a partir del tercer día de la siembra. Para su conservación por congelación se utiliza el mismo medio de crecimiento suplementado con glicerol tridestilado al 5 %, presentando al descongelar una viabilidad del 90 %.

El tiempo de generación del ciclo celular de las células MMT es de 14 horas 20 minutos, una duración de la fase G2 de 2 horas 30 minutos, una fase S de 6 horas, un tiempo de mitosis de 50 minutos y una fase G1 de 7 horas. En la figura 4 puede verse la curva de crecimiento de estas células.

La eficiencia de planqueo es de 21 %. Las pruebas de tumorigenicidad dan al 100 % de tumor en los animales tras la inoculación de ratones singénicos con 1.000.000 de células por vía subcutánea.

III.C.3. TECNICAS DE VIABILIDAD Y RECUESTO CELULAR

El recuento celular es el método para calcular el número de células existentes en los cultivos, interesándonos las que son viables.

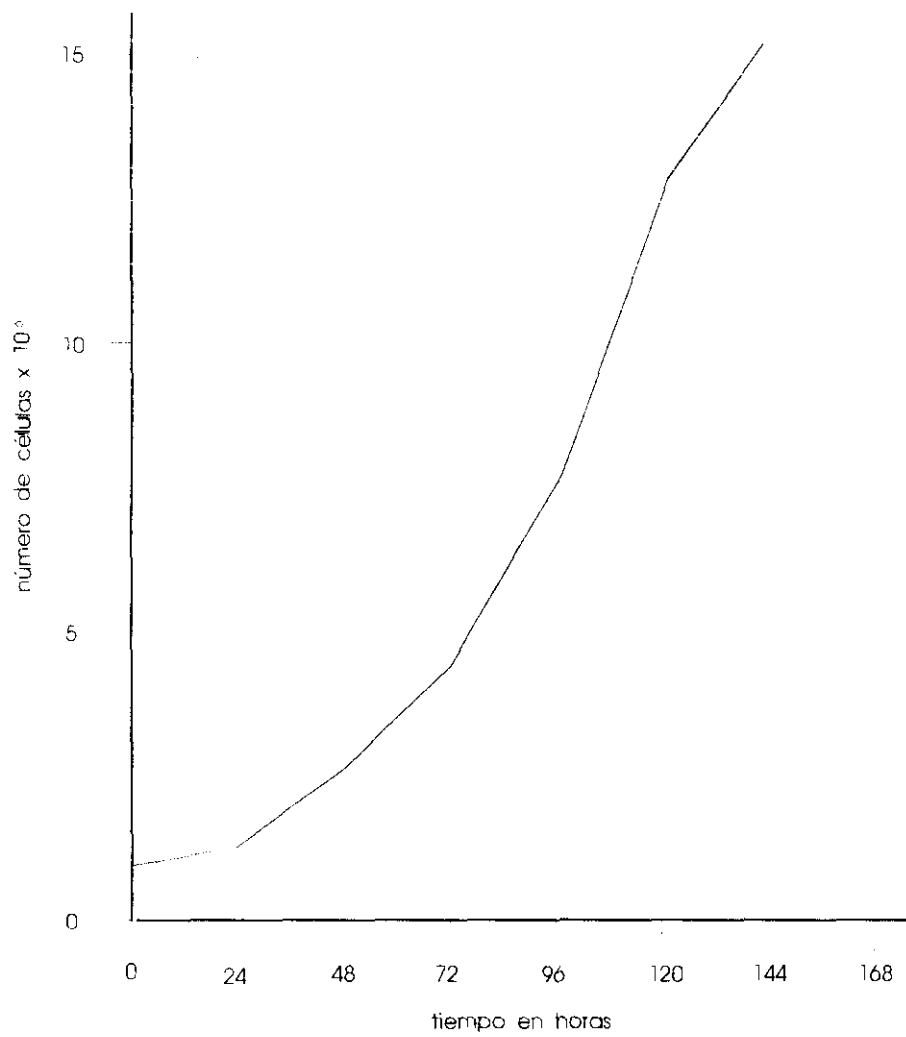


Figura 4
Curva de crecimiento de las células MMT

A la vez que el número de células que se siembra, conviene saber la proporción de ellas que son viables, porque algunas sufren durante las maniobras del subcultivo. Existen varios procedimientos para reconocer las células viables. Uno de ellos, aprovecha la propiedad de la membrana celular funcionalmente intacta para rechazar algunos colorantes que, contrariamente, difunden pasivamente en las células muerta so con alteraciones de la membrana, quedando teñidas. Se habla de colorantes de exclusión, entre los cuales se encuentran el azul tripán (Pappenheimer, 1927; McLimans y col., 1957; Kruse y Patterson, 1973) y la eritrosina B (Phillips y Andrews, 1959).

Estas sustancias generalmente no son tóxicas a las concentraciones empleadas; la toxicidad no afectaría a las células de los cultivos, ya que para el recuento celular se utiliza una pequeñísima alícuota que se separa de la suspensión celular, pero se debe comprobar que el producto empleado carece de toxicidad para las células que se cuentan, porque podría llevar a un cálculo inferior al real de la viabilidad.

Para realizar el recuento se debe disponer de una suspensión celular que tenga entre 100.000 y 1.000-000 de células/ml, con lo que se obtienen menores errores de cálculo. En caso de resultar una suspensión muy concentrada, se diluye con el medio de cultivo y se vuelve a contar. Se toma 0,5 ml de suspensión celular, se añade 0,15 ml de solución de eritrosina B al 0,4 % en solución GKN [1x] o 0,5 ml de solución de azul tripán al 0,05 % en solución GKN [2,5x], se agita suavemente y

se mantienen a temperatura ambiente ocho minutos. A continuación, se resuspenden las células con una pipeta Pasteur y se deposita una gota en el extremo del cubroobjetos de una cámara de Neubauer.

Las células viables se ven refringentes y sin colorante en el interior, mientras las degeneradas o muertas se tiñen con el colorante.

Se cuentan los cinco campos de los dos retículos grandes, cada campo subdividido en dieciseis cuadrillos, a fin de obtener la concentración en número de células/ml. Multiplicar por 1.000, factor de la cámara en función del grosor de la suspensión celular entre el cubreobjetos y la superficie de la cámara. El número resultante se multiplica por el factor de dilución introducido por la solución colorante. Así, si a 0,5 ml de la suspensión celular original se le añadieron 0,15 ml de la solución de eritrosina B; el factor de dilución es de 1,3, por el que se debe multiplicar.

III.C.4. CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES CELULARES

Cada línea celular crece a un ritmo determinado, y es importante conocerlo con objeto de calcular su tiempo medio de generación, que corresponde al tiempo que transcurre para que la población celular en fase de crecimiento logarítmico o exponencial se duplique.

Uno de los métodos utilizados para obtener una curva de

crecimiento consiste en sembrar una serie de catorce frascos de igual superficie de cultivo en las condiciones equivalentes de concentración celular, que marca el comienzo de la curva, que es el número de células/ml sembrado. Cada 24 horas se desprenden las células de dos frascos con solución de tripsina al 0,2 %, se procede al recuento de alícuotas de cada frasco y se saca la media. Los catorce frascos permiten trasladar a la curva el progreso celular a lo largo de siete días.

Otro de los procedimientos que hemos utilizado es el de la cinefotomicrografía de intervalos en contraste de fases. Se hacen subcultivos celulares de la manera habitual y se mantiene el frasco dentro de la cámara de incubación del equipo de registro. Los frascos de cultivo deben proporcionar imágenes claras. Para poder realizar los cambios de medio de cultivo, los frascos se conectan con cánulas. La cámara de incubación se mantiene a 37° C, se coloca el intervalómetro a la velocidad de filmación de fotogramas conveniente y se pone en marcha la película. La película que se obtiene permite el recuento de varios campos después de la siembra y el cálculo del número de células en esos mismos campos cada 24 horas. Para obtener una buena curva de crecimiento conviene contar un número elevado de células.

Además del tiempo de generación o tiempo de duplicación del número de células en la fase de crecimiento logarítmico, región de la curva en que se obtiene una línea recta, la cinefotomicrografía permite calcular los tiempos de duración de

mitosis individuales y los tiempos de generación entre mitosis sucesivas. Para conseguir un buen promedio de tiempo de generación se debe contar un número elevado de células, no menos de 100, y promediar sus valores.

En los cultivos en suspensión se hace el recuento tomando muestras de los recipientes de cultivo cada 24 horas a partir del subcultivo. El hecho de que los tubos de cultivo en suspensión tengan unos 20 ml de medio de cultivo y se necesiten únicamente 10 μ l diarios para el recuento y construcción de la curva de crecimiento impide que se produzcan alteraciones significativas.

III.C.5. EFICIENCIA DE PLANCHEO

Se llama eficiencia de plancheo al índice de capacidad de las células dispersas para dar lugar a poblaciones clonales a partir de células individuales (Puck y Marcus, 1955, 1956). La eficiencia de plancheo varía con la línea celular y con las condiciones de cultivo, siendo mayor para células transformadas y muy baja para células normales de tejidos adultos.

Para calcular la eficiencia de plancheo se utiliza medio de cultivo y condiciones de incubación habituales. Se siembran 20 células/cm² en frascos Corning de 25 cm² de superficie de cultivo. El pH debe mantenerse en 7,2 a lo largo de la prueba, para lo cual se incuban los frascos en estufa a 37° C en atmósfera de aire con CO₂ al 5 % saturada de humedad. Las

células se fijan, se tiñen y se cuenta el número de clones que contengan más de 32 células entre el octavo y el duodécimo día.

Para fijar las células se decanta el medio de cultivo, se lavan dos veces con solución salina equilibrada y se fijan durante dos horas con solución de Bouin a temperatura ambiente. Se decanta el sobrenadante y se lavan de nuevo las células tres veces con etanol al 70 %; hasta el momento de la tinción, se conservan igualmente en etanol al 70 %.

Para teñir las células se utiliza cualquiera de las tinciones histológicas o citológicas y se cuenta, como se indicó, el número de clones desarrollados, calculando el porcentaje de células viables sembradas que han desarrollado clones.

III.CH. MEDIOS DE CULTIVO PARA PRUEBAS DE ESTERILIDAD BACTERIANA, MICOLOGICA Y MICOPLASMICA

III.CH.1. INFUSION DE CEREBRO Y CORAZON

Agar Oxoid N° 3	0,5	g
Infusión de cerebro y corazón (Oxoid)	18,5	g
H ₂ O bidestilada, c.s.p.	500	ml

Disolver al baño María.

Distribuir 10 ml por tubo.

Esterilizar al autoclave a 115° C durante 20 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente.

Almacenar a 4° C.

Para cultivos en plano inclinado usar agar al 1 %, echar caliente en los tubos y dejarlos enfriar con la inclinación conveniente hasta que solidifique el medio de cultivo.

Los medios se inoculan con 0,5-1,0 ml del material a ensayar y se incuban a 37° C durante una semana.

Los cultivos inclinados se raspan superficialmente con un asa bacteriológica cargada con la muestra a ensayar.

III.CH.2. MEDIO DE TIOGLICOLATO DE BREUER

Medio de tioglicolato de sodio (Oxoid)	14,9 g
--	--------

H ₂ O bidestilada, c.s.p.	500 ml
---	--------

Distribuir 10 ml por tubo.

Esterilizar al autoclave a 115° C durante 20 minutos.

Almacenar a 4° C.

Los cultivos en plano inclinado y las siembras se hacen de la misma manera que se indicó para la infusión de cerebro y corazón.

III.CH.3. AGAR DEXTROSA DE SABOURAUD (ADS)

Agar dextrosa de Sabouraud (Oxoid)	16,25 g
--	---------

H ₂ O bidestilada, c.s.p.	250 ml
---	--------

Disolver al baño María.

Distribuir 10 ml por tubo.

Esterilizar al autoclave a 115° C durante 20 minutos.

Dejar inclinados hasta que solidifiquen.

Guardar a 4° C.

Este medio permite el reconocimiento de contaminaciones con hongos.

III.CH.4. MEDIO DE AGAR SANGRE EN EXTRACTO DE FILDES PARA MICROORGANISMOS L Y PPLO (MICOPLASMAS)

Fórmula para 125 c.c.

Fundir 100 ml de agar sangre base "Oxoid" (CM55)

Enfriar a 50° C y añadir 5 ml de extracto de Fildes (Oxoid SR46) en 20 ml de sangre o plasma humanos, o bien en 20 ml de caldo de yema de huevo (Oxoid CM6).

Gasear con CO₂ al 5 %.

Verter en placas y dejar solidificar.

Sembrar unas gotas de la muestra a ensayar en la superficie.

Incubar a 37° unas placas en aerobiosis y otras en anaerobiosis (atmósfera de 5 % CO₂ + 95 % N₂).

Sellar con parafina-glicerol para evitar desecación.

Observar con el estereomicroscopio cada 2 días (las placas aparecen entre los 2 y 10 días) (las colonias de micoplasmas aparecen como "huevos fritos").

Pueden subcultivarse cogiendo fragmentos de agar con colonias y frotándolas suavemente sobre la superficie de nuevas

placas.

Se pueden conservar bloques de agar con colonias en frasquitos adecuados a -70° C.

III.D. TECNICAS DE CONGELACION Y DESCONGELACION

Las líneas celulares que no se utilizan en un momento dado o se tienen como reserva de seguridad se deben conservar para usos futuros.

La mayor parte de las líneas celulares se pueden mantener vivas de forma indefinida mediante congelación a -76° C o menos, método en cuyo perfeccionamiento han tenido un papel muy importante las aportaciones de Barnes y Furth (1937), Breednis y Furth (1938), Meryman (1956, 1957), Rey (1957a, 1957b) y Swim y col. (1958).

Los medios que se utilizan para la congelación, en general son los de mantenimiento suplementados con glicerol tridestilado o dimetilsulfóxido (DMSO), en ambos casos a una concentración de 5 a 10 %.

El procedimiento de congelación que utilizamos consiste en la disminución térmica de 2 a 3° C por minuto de las suspensiones celulares en medio de congelación hasta alcanzar una temperatura próxima al punto de solidificación del medio, momento en que la suspensión celular se transfiere a un recipiente de nitrógeno líquido (fase gaseosa), o a un congelador de -90° C para producir un descenso térmico brusco

e impedir cristalizaciones y recristalizaciones que pueden dañar a las estructuras celulares.

La descongelación de las muestras se realiza intentando alcanzar la temperatura de 37° C en el menor tiempo posible, por lo que se realiza mediante agitación continua en baño a 37° C. A continuación se diluye la suspensión en su medio de cultivo habitual y se siembran las células.

El momento idóneo para proceder a la congelación, en el caso de las células cultivadas en monocapa, es en la fase de crecimiento logarítmico. Primero se realiza el desprendimiento celular. Se resuspenden las células en su medio de congelación y se toma una muestra para recuento y para pruebas de esterilidad. La suspensión celular se pone a una concentración en la que el número de células viables que haya en 1 ml sea unas tres veces mayor al requerido para la siembra de un subcultivo ordinario, para compensar las pérdidas que puedan producirse. La suspensión se distribuye en viales de congelación de 2 ml y se procede a la congelación.

Para evitar el daño que puede producirse con el aumento de temperatura en los casos en que se utiliza el DMSO, se prepara el medio de cultivo con DMSO al doble de la concentración final necesaria. La suspensión celular se dispone al doble del número de células que se desea congelar y se mantiene en medio sin DMSO en baño de hielo durante 10 minutos. A continuación, se mancomuna con el mismo volumen de medio con DMSO para que quede a la concentración deseada.

III.E. OBTENCION DE LINFOCITOS PARA SU CULTIVO "IN VITRO"

III.E.1. LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFERICA

Se extrae sangre venosa, se pasa a un tubo de vidrio estéril y se procede a la desfibrinación removiendo con una varilla de cristal. Se centrifuga, se recoge el suero, se resuspenden las células en el mismo volumen de solución GKN [1x] y se forma gradiente con solución separadora de linfocitos (ficoll) en una relación de 4 para 3 en un tubo de policarbonato. Se centrifuga y se recoge con una pipeta estéril la zona que posee el mayor número de linfocitos purificados, que es la que queda justo por debajo de la interfase. Se lava con solución GKN [1x], se desprecia el sobrenadante; la pella se resuspende en el medio elegido, se realiza el recuento de células viables y se procede a la siembra a la concentración requerida.

III.E.2. LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE RATON

Se hepariniza al ratón por vía intraperitoneal mediante 100 μ l de heparina; a los diez minutos se lleva a cabo la decapitación o la punción cardíaca, recogiendo la sangre en un tubo estéril con 10 ml de solución GKN [1x] más 50 μ l de heparina. Se procede a la formación de un gradiente de densidad con una solución de ficol del mismo modo que el desarrollado en

el apartado anterior.

III.F. SOLUCIONES Y MEDIOS NUTRITIVOS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE CELULAS "IN VITRO"

III.F.1. SOLUCION GKN

Esta solución es muy empleada para el lavado de las células. Habitualmente se le llama solución GKN: G por glucosa, K por el KCl y N por el NaCl que intervienen en su composición.

Para almacenarla se prepara una solución con una concentración diez veces más que la isotónica o solución GKN [10x], a partir de la cual se prepara la solución isotónica de trabajo o solución GKN [1x] por dilución con agua bidestilada y adición de una pequeña cantidad de bicarbonato de sodio como amortiguador del pH y rojo fenol como indicador del mismo.

Solución GKN [10x]

Glucosa	10	g
KCl	4	g
NaCl	80	g
Rojo fenol al 1 %	20	ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1.000	ml

Distribuir en alícuotas de 500 ml, esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

Solución GKN [1x]

GKN [10x]	100	ml
NaHCO ₃ al 1,4 %	20	ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1000	ml

Esterilizar por filtración a presión, distribuir en alícuotas de 100 ml y almacenar a temperatura ambiente.

III.F.2. SOLUCION SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS DE DULBECCO

Esta solución es muy utilizada por su elevada capacidad amortiguadora del pH (Dulbecco y Vogt, 1954). Se abrevia comunmente solución PBS (por "phosphates buffered saline") o solución salina amortiguada con fosfatos.

La solución isotónica o solución PBS [1x] se elabora preparando tres fracciones que se mezclan de la siguiente manera:

Primera fracción:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua bidestilada, c.s.p.	500 ml

Segunda fracción:

CaCl ₂	0,1 g
Agua bidestilada, c.s.p.	250 ml

Tercera fracción:

MgCl ₂	0,1 g
Agua bidestilada, c.s.p.	350 ml

Esterilizar cada fracción por separado en autoclave a 115° C durante 20 minutos. Una vez esterilizadas, reunir las en orden y añadir:

Rojo fenol al 1 %	10 ml
-------------------------	-------

Esterilizar por filtración a presión, distribuir en alícuotas de 100 ml y almacenar a temperatura ambiente.

III.F.3. SOLUCION SALINA EQUILIBRADA DE EARLE

Earle (1943) ideó una solución salina, cuya composición se indica a continuación. Para almacenar, se prepara una solución concentrada diez veces o solución de Earle [10x], a partir de la cual se consigue la solución isotónica [1x] por dilución con agua bidestilada, a la que se añade rojo fenol como indicador de pH.

Solución salina de Earle [10x]

Primera fracción:

NaCl	68	g
KCl	4	g

MgSO ₄	0,98	g
Agua bidestilada, c.s.p.	500	ml

Segunda fracción:

NaH ₂ PO ₄	1,4	g
D-glucosa	10	g
Agua desionizada y bidestilada, c.s.p. .	350	ml

Tercera fracción:

CaCl ₂	2	g
Agua bidestilada, c.s.p.	100	ml

Esterilizar las tres fracciones por separado al autoclave a 115° C durante 30 minutos. Mancomunar y completar con:

Agua bidestilada, c.s.p.	1000	ml
-------------------------------	------	----

Solución salina de Earle isotónica [1x]

Solución salina de Earle [10x]	100	ml
Rojo fenol al 1 %	2	ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1000	ml

III.F.4. SOLUCION SALINA EQUILIBRADA DE HANKS

(Hanks y Wallace, 1949).

Las soluciones de provisión [10x] y la isotónica de trabajo [1x] se preparan como sigue:

Solución de Hanks concentrada [10x]

Primera fracción:

NaCl	80	g
KCl	4	g
MgSO ₄	1	g
MgCl ₂	1	g
Agua bidestilada, c.s.p.	500	ml

Segunda fracción:

Na ₂ HPO ₄	0,6	g
KH ₂ PO ₄	0,6	g
Glucosa	10	g
Agua bidestilada, c.s.p.	250	ml

Tercera fracción:

CaCl ₂	1,4	g
Agua bidestilada, c.s.p.	250	ml

Esterilizar las tres fracciones por separado en autoclave a 115° C durante 20 minutos. Mancomunar y completar con:

Agua bidestilada, c.s.p.	1000	ml
-------------------------------	------	----

Esterilizar por filtro a presión, distribuir en alícuotas de 1.000 ml y almacenar a temperatura ambiente.

Nota.- La solución [10x] se prepara sin bicarbonato de sodio, que se añade al preparar la solución [1x].

Solución de Hanks isotónica [1x].

Solución de Hanks [10x]	100	ml
-------------------------------	-----	----

NaHCO ₃ al 1,4 %	10	ml
Rojo fenol al 1 %	2,5	ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1000	ml

Esterilizar por filtración, distribuir en alícuotas de 100 ml y almacenar a temperatura ambiente.

III.F.5. SOLUCION DE TRIPSINA AL 0,2 %

Esta solución enzimática se utiliza para desprender las células de las monocoapas con objeto de proceder a su subcultivo.

Fórmula para 1.000 ml.

Hacer una pasta con:

Tripsina 1:250 Difco	2	g
Solución GKN [1x]		pequeña

cantidad

Disolver en:

Solución GKN [1x]	900	ml
NaHCO ₃ al 1,4 %	60	ml

Agitar hasta disolver al máximo (suele quedar un pequeño residuo insoluble).

Añadir:

Rojo fenol al 1 %	2	ml
Solución GKN [1x], c.s.p.	1000	ml

Pasar por papel filtro, esterilizar por filtración,

distribuir en alícuotas de 10, 25 y 50 ml y conservar congelando a -20°C .

III.F.6. SOLUCIONES PARA RECuento CELULAR

III.F.6.a. Solución de cristal violeta al 0,01 %

Se utiliza para conseguir una suave coloración para facilitar el recuento de células totales.

Acido cítrico	4,8 g
Cristal violeta	0,015 g
Agua bidestilada, c.s.p.	200 ml

Distribuir en alícuotas de 50 ml, esterilizar al autoclave a 115°C durante 20 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

III.F.6.b. Colorante de exclusión de eritrosina B al 0,4 %

Se emplea para reconocer las células viables, que rechazan el colorante y no se tiñen, en tanto que las células degeneradas o muertas incorporan el colorante y toman un color rojo.

Eritrosina B	0,4 g
Solución GKN [1x] c.s.p.	100 ml

Distribuir en alícuotas de 10 ml, esterilizar al autoclave a 115°C durante 20 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

III.G. MEDIOS NUTRITIVOS PARA EL CULTIVO DE CELULAS "IN VITRO"

III.G.1. MEDIO ESENCIAL MINIMO (MEM) DE EAGLE

Utilizamos el medio esencial mínimo de Eagle (1959) en solución de Hanks con glutamina, desecado, al que se añade bicarbonato de sodio y se reconstituye con agua bidestilada estéril.

MEM base en polvo,

con glutamina, sin NaHCO_3 (Flow)	107,8 g
NaHCO_3	3,5 g
Agua bidestilada estéril, c.s.p.	10 l

Esterilizar por filtro a presión y almacenar a 4° C.

Para su empleo como medio de crecimiento, el medio esencial mínimo de Eagle (MEM) se suplementa con aminoácidos no esenciales, antibióticos y suero sanguíneo.

III.G.2. MEDIO R5A DE MCCOY

El medio R5a de McCoy (McMcoy, 1959) lo hemos utilizado en ocasiones preparándolo a partir de sus componentes, de la siguiente manera:

Solución de Hanks [10x]	500	ml
Solución de aminoácidos [10x]	500	ml
Solución de vitaminas [50x]	100	ml
Solución de rojo fenol al 1 %	10	ml
NaHCO_3	3,5	g
Glutamina [100x]	50	ml

Solución de glucosa al 10 %	100	ml
Hidrolizado de lactalbúmina	25	mg
Agua bidestilada estéril, c.s.p.	5.000	ml

Clarificar, prefiltrar, esterilizar por filtración y almacenar a 4° C.

Antes de su uso, este medio se suplementa con suero sanguíneo y antibióticos.

Como se puede ver, el medio R5a de McCoy lo preparamos utilizando soluciones concentradas de algunos productos, que facilitan su mantenimiento en provisión. Sus composiciones son las siguientes:

Solución de aminoácidos de McCoy [10x]

L-Triptofano	145	mg
L-Fenil-alanina	825	mg
L-Tirosina	905	mg
L-Arginina (HCl)	2.105	mg
L-Histidina (HCl)	1.045	mg
L-Lisina (HCl)	1.825	mg
L-Cisteína	1.750	mg
L-Metionina	745	mg
L-Isoleucina	1.965	mg
L-Leucina	1.965	mg
L-Valina	880	mg
L-Treonina	895	mg
L-Asparragina	2.250	mg

L-Glicina	375	mg
L-Serina	1.315	mg
L-Alanina	670	mg
L-Prolina	865	mg
L-Hidroxiprolina	985	mg
Acido L-aspartico	995	mg
Acido L-glutámico	1.105	mg
Agua tridestilada, c.s.p.	5.000	ml

Disolver en el orden indicado y distribuir en alícuotas de 500 y 250 ml. Conservar a -20° C.

Solución de vitaminas de McCoy [50x]

Tiamina (HCl)	20	mg
Riboflavina	20	mg
Piridoxal (HCl)	50	mg
Piridoxamina	50	mg
Acido nicotínico	50	mg
Nicotinamida	50	mg
Pantotenato de calcio	20	mg
Biotina	20	mg
Acido fólico	20	mg
Cloruro de colina	500	mg
Inositol	3.650	mg
Acido paraaminobenzoico	100	mg
Acido ascórbico	50	mg

Glutation	50 mg
Cianocobalamina	75 mg
Agua tridestilada, c.s.p.	2.000 ml

Disolver en el orden indicado y distribuir en alícuotas de 100 ml. Conservar a -20° C.

Solución de glutamina 200 mM

Glutamina	29,3 g
Agua desionizada y bidestilada, c.s.p.	1.000 ml

Disolver y distribuir en alícuotas de 100 ml. Conservar a -20° C.

Solución de glucosa al 10 %

Glucosa	100 g
Agua desionizada y bidestilada, c.s.p.	1000 ml

Disolver, distribuir en alícuotas de 100 ml, esterilizar al autoclave a 115° C durante 20 minutos con desvaporización lenta para evitar que se caramelize.

Solución de rojo fenol

Rojo fenol	10 g
Solución de NaHCO ₃ 0,05 N	600 ml
Agua tridestilada, c.s.p.	200 ml

Disolver el rojo fenol en la solución de NaHCO₃ y luego añadir el agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con solución NaHCO₃ 0,05 N. Se necesitan unos 50 ml. Ajustado el pH, añadir:

Agua tridestilada, c.s.p. 1.000 ml
 Distribuir en alícuotas de 10 ml y esterilizar al
 autoclave.

III.G.3. MEDIO R5a-I (MEDIO R5A DE McCOY MODIFICADO POR IWAKATA)

(Iwakata y Grace, 1964)

Medio R5a en polvo (Flow) (R5a base de
 Iwakata con glutamina, sin NaHCO_3) 122,1 g
 NaHCO_3 22 g
 Agua bidestilada estéril, c.s.p. 10 ml
 Esterilizar por filtración a presión y almacenar a 4° C.
 Para su utilización como medio de crecimiento, se
 suplementa con suero sanguíneo y antibióticos.

III.H. TECNICAS DE FIJACIÓN Y TINCIÓN CITOLÓGICA

III.H.1. CELULAS CULTIVADAS "IN VITRO"

Los cultivos destinados a estudios morfológicos
 normalmente se realizan en recipientes diseñados para este
 fin, pudiendo ser portaobjetos o cubreobjetos de vidrio o
 plástico. El modelo más utilizado por nosotros es el de
 cultivos preparados en tubos de Leighton.

Se siembran varios tubos de Leighton con 1 ml de la suspensión celular de forma que la relación de células por cm^2 de superficie sea del orden que la utilizada en las condiciones de mantenimiento.

III.H.2. FIJADORES

III.H.2.a. Fijador de Bouin

Se prepara de la siguiente manera:

Solución saturada de ácido pícrico

(1,4 % en agua)	75	ml
Formaldehído al 40 %	25	ml
Acido acético glacial	5	ml

III.H.2.b. Formol neutro amortiguado al 10 %

Preparar de la siguiente manera:

Formol comercial (aproximadamente al 40 %)	50	ml
Agua bidestilada, c.s.p.	450	ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,26	g
Na_2HPO_4	3,25	g

Primero se disuelven las sales en el agua y después se añade el formol.

III.H.3. METODOS DE TINCIÓN

III.H.3.a. Tinción con hematoxilina y eosina

Se cogen los cortes o cultivos en cubreobjetos fijados en fijador de Bouin y conservados en etanol al 70 % y se lavan con agua. A continuación, se sumergen durante 3-5 minutos en hematoxilina y se lavan de nuevo con agua, hasta que no suelten color. Pasarlos a agua bidestilada hasta que vire. Después, se sumergen en eosina entre 30 segundos y 2 minutos y se lavan con agua, hasta que no suelten color. Se deshidratan en baños sucesivos de etanol 70°, 96° y absoluto, se aclaran en xilol y se montan en balsamo de Canadá.

a.1 Solución de hematoxilina de Caracci

Preparar de la siguiente manera:

Hematoxilina	0,5 g
Iodato potásico	0,1 g
Alumbre potásico	25 g
Glicerina bidestilada	100 ml
Agua, c.s.p.	500 ml

En un mortero se mezclan hematoxilina y iodato potásico, machacando hasta obtener una mezcla pulverizada compacta morada. Añadir el alumbre potásico y volver a machacar hasta obtener un polvo muy fino. Añadir la glicerina poco a poco y mezclar hasta conseguir una pasta espesa. Añadir el agua y dejar madurar durante una semana.

a.2. Solución de eosina

Preparar de la siguiente manera:

Eosina amarilla	1 g
Agua c.s.p.	100 ml

III.H.3.b. Tinción con Giemsa

Preparar extensiones o cultivos en cubreobjetos o microplacas y secar al aire. A continuación, fijar en metanol absoluto durante 20 minutos. Decantar el fijador y añadir solución de Giemsa patrón diluída a 1/10 con buffer de Sorensen preparado en el momento y filtrado justo antes de su uso, dejándola actuar durante 6 minutos. Decantar y lavar con abundante agua corriente. Secar al aire y montar en bálsamo de Canadá.

b.1. Solución patrón de Giemsa

Se prepara utilizando:

Giemsa en polvo	0,757 g
Glicerol	50 ml
Metanol absoluto purísimo neutro	50 ml

Disolver el polvo de Giemsa en el glicerol a 56° C durante 2 horas, o bien agitar durante una noche a 37° C. Añadir el metanol absoluto y dejar envejecer 2 semanas.

III.H.3.c. Tinción de May-Grünwald-Giemsa

Las extensiones o los cultivos se preparan en cubreobjetos o microplacas y se dejan secar al aire, fijándose posteriormente en metanol absoluto durante 20 minutos. Decantar el fijador y añadir colorante de May-Grünwald durante 5 minutos y, sin decantar, añadir un volumen igual de agua bidestilada. Decantar y continuar la tinción como se describió para la tinción con Giemsa.

c.1. Solución de May-Grünwald

Preparar de la siguiente manera:

Colorante de May-Grünwald en polvo 2,5 g

Metanol absoluto purísimo neutro 1000 ml

Disolver el colorante de May-Grünwald en polvo en el metanol absoluto y agitar durante una noche a 37° C. Dejar envejecer 1 mes.

III.I. *TECNICA DE LA CINEFOTOMICROGRAFA DE INTERVALOS EN CONTRASTE DE FASES*

La cinefotomicrografía de intervalos en contraste la utilizamos en este trabajo para observar los fenómenos ocasionados por los sueros y linfocitos tóxicos sobre las células.

III.I.1. EQUIPO UTILIZADO Y CONDICIONES DE FILMACIÓN

Utilizamos un microscopio invertido Nikon, modelo M, para poder realizar una observación prolongada de los cultivos en monocapa en recipientes similares a los utilizados en los cultivos de mantenimiento, estando las células cubiertas por medio nutritivo.

Al equipo se incorpora una cámara de incubación, la cual permite mantener la temperatura a 37°C , con una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, gracias a un dispositivo de inyección de aire caliente, regulada por un dispositivo de control frente a las variaciones de temperatura detectadas por un termopar colocado próximo al recipiente en observación.

Se pueden adaptar distintos sistemas ópticos, como campo claro, campo oscuro, polarización y contraste de fases, siendo este último el que mejor se adapta a la mayoría de nuestros estudios, permitiendo la visualización en las células de un mayor número de estructuras.

La distancia focal es larga, pudiendo emplearse recipientes de hasta 17 mm de altura, como los de Earle T-15, sin necesidad de utilizar microcámaras especiales.

El microscopio es está diseñado para usar dos salidas de recogida de imagen: a una se adaptan el portaoculares y el tubo para la cámara de fotografía; la otra es una salida horizontal para la adaptación de una cámara de cine.

El equipo tiene adaptado también un sistema de

sobreimpresión de datos para rotular las películas y señalar los fenómenos observados durante el rodaje.

La cámara que utilizamos es una Paillard Bolex de 16 mm, con un intervalómetro Nikon, que puede funcionar manual o automáticamente a través de una célula fotoeléctrica, y que dispone de un sistema auxiliar para la iluminación sincrónica con flash, que va a permitir rodar cadencias que van desde 4 imágenes (i) por segundo hasta 2 imágenes por hora. En nuestro caso, la cadencia de filmación se programó en función de la duración del fenómeno en estudio, utilizando aceleraciones entre 4 i/segundo y 1 i/minuto.

Se intenta obtener unas condiciones lo más iguales a las seguidas en el mantenimiento de las células, así como en las titulaciones de serotoxicidad y linfotoxicidad, para poder extrapolar los datos obtenidos. Por ello, las células se siembran en frascos de Earle T-15, de cristal, o Falcon, de plástico, cuya altura permite ajustar en condiciones óptimas la iluminación y el contraste de fases, en la misma relación de células/superficie que en el mantenimiento.

Para poder llevar a cabo las inoculaciones y los cambios de medio sin desplazamiento de los frascos de los sistemas de observación y registro, se adaptaron a los frascos tapones de silicona perforados con dos cánulas metálicas, de entrada y de salida, conectadas a tubos de silicona adaptables a jeringas desechables.

Para evitar desplazamientos, los recipientes y las cánulas

se fijaron a la platina y cámara de incubación mediante cinta adhesiva.

Las variaciones técnicas y el desprendimiento de CO_2 durante el catabolismo celular producen con frecuencia desenfoques que pueden evitarse equilibrando las presiones interior y exterior, siempre preservando la esterilidad con un filtro Millex de $0,45 \mu\text{m}$ de poro en la cánula de entrada.

Para la filmación se utilizaron carretes "Eastman Color negativa" tipo 7247 o "Plus X negative" tipo 7231, los cuales fueron señalizados y rotulados empleando el equipo de sobreimpresión de datos.

III.I.2. PROTOCOLO DE REGISTRO DE DATOS DE LA FILMACIÓN

Para poder llevar a cabo una correlación de los tiempos reales con las variaciones técnicas y las maniobras experimentales, se registraron en los protocolos correspondientes las variaciones introducidas durante el rodaje, cuyo modelo podemos verlo en la tabla IV.

Los carretes impresionados son procesados y, si el negativo es adecuado, se hace una copia para realizar el estudio de los fenómenos registrados en ella, guardando intacto el negativo para posteriores copias.

PROTOCOLO DE CINEFOTOMICROGRAFÍA

Experimento n.º
 Realizador
 Preparación y finalidad

 Sistema y condiciones de observación

 Película n.º
 Marca y tipo de película
 Temperatura de color de la película (°K)
 Filtros utilizados
 Sensibilidad de la película (DIN o ASA)

Objeto:
Aceleración Cambio de imagen C o S automático Apertura de sector Tiempo de exposición Microamperímetro (pA) Apertura de diafragma Condensador Objetivo Ocular Optovar
N.º inicial de imagen N.º final de imagen N.º imágenes tomadas Metros de película (iniciales/restantes) Tiempo de proyección a 18 i/seg. Tiempo real correspondiente
Fechas y horas

Observaciones:

Tabla IV

PROTOCOLO DE CINEFOTOMICROGRAFÍA

III.I.3. ANALISIS DE LAS PELÍCULAS

El análisis de las películas se puede hacer con un proyector que pueda detener la imagen y proyectar hacia atrás y, en condiciones óptimas, con un analizador de imágenes. Nosotros utilizamos una solución intermedia, realizando el estudio con un equipo Moviola modelo M77AH, que permite el visionado imagen por imagen a cadencia normal y a alta velocidad hacia delante y hacia atrás.

El equipo lleva incorporado un dispositivo con el que podemos conocer directamente el tiempo de proyección a 24 i/seg y el número de fotogramas en cada momento. De esta manera, con los datos registrados en el protocolo se pueden determinar las variaciones producidas en función del momento en que se han realizado las distintas maniobras y medir la duración de cada uno de los fenómenos registrados.

Los parámetros que pueden estudiarse son numerosos, como las variaciones del número de células por campo, número de mitosis, número de degeneraciones, velocidad de desplazamiento o movimientos de distintas estructuras celulares.

III.J. TECNICAS PARA MICROSCOPIO ELECTRONICO

III.J.1. PROCEDIMIENTO PARA CULTIVOS DE CELULAS "IN VITRO"

III.J.1.a. Fijación

Se siembran frascos Jena en las condiciones óptimas para

controles morfológicos de microscopía electrónica. En los momentos elegidos se procederá de la siguiente manera.

Se decanta el medio de cultivo y se lavan las células dos veces, a temperatura ambiente, con solución de Millonig- Cl_2Ca a 4° C, utilizando para cada lavado un volumen igual al que tenía el frasco de cultivo.

Fijar con glutaraldehído al 1,5 % en solución de Millonig pH 7,3 a 4° C durante 30 minutos. Decantar y lavar tres veces de 1-2 minutos con 15 ml de Millonig- Cl_2Ca a 4° C. Sin decantar en el último lavado, desprender con espátula y transferir el contenido del frasco a un tubo cónico de centrífuga. Centrifugar durante 5 minutos a 125 x G.

Decantar bien el sobrenadante y añadir con cuidado sobre la pella, sin removerla, 0,5 ml de tetróxido de osmio al 1 % en solución de Millonig pH 7,3 a 4° C. Tapar los tubos con "Parafilm" y mantenerlos en nevera o recipiente con hielo en la campana de aspiración forzada. Transcurridos 30 minutos, desprender la pella con varilla de cristal y dejar actuar el fijador durante otros 15-30 minutos.

Centrifugar durante 2 minutos a 125 x G sin destapar los tubos. Decantar el fijador, añadir 5-10 ml de amortiguador de Millonig a 4° C, resuspender suavemente con varilla y volver a centrifugar en las mismas condiciones. Esta operación se repite dos veces más.

Decantar el sobrenadante y sumergir unos minutos el tubo en baño de 45° C. Añadir 2 ml de agar al 2 % a 45° C,

resuspendeer con varilla y centrifugar 5 minutos en las condiciones anteriores, con los adaptadores precalentados a 45° C.

Pasar los tubos a 4° C a baño de hielo hasta que el agar quede bien solidificado y desprender con varilla dejando que entre aire y girando el agar con la pella incluida. recoger sobre placa de Petri y cortar la pella con una hoja de afeitar.

Llegado este momento, la pella puede manipularse, a efectos de deshidratación e inclusión, de la misma forma que las muestras de tejidos.

III.J.1.b. Deshidratación e inclusión

Una vez fijados y lavados los fragmentos procedentes de tejidos o cultivos incluidos en agar, para llevar a cabo su deshidratación se transfieren a soluciones de acetona en concentración creciente, 50°, 70°, 70° con acetato de uranilo al 0,5 %, 90°, acetona absoluta y acetona absoluta sobre sulfato de cobre deshidratado.

Terminada la deshidratación, transferir a óxido de propileno e incluir en Durcupan o Araldite.

III.J.1.c. Preparación de cortes ultrafinos

Una vez finalizada la polimerización separar las cápsulas, tallar el bloque y realizar cortes de 400-600 Å con un

ultramicrotomo "LKB" modelo 2128, utilizando cuchillas de cristal. Se recogen los cortes y se procede a su tinción.

III.J.1.ch. Tinción de los cortes

Durante el proceso de deshidratación en acetona de 70° con acetato de uranilo al 0,5 %, las muestras adquieren ya un contraste suficiente como poderlas visualizar. Sin embargo, para conseguir una mayor nitidez se tiñen con citrato de plomo de Reynold.

En una placa de Petri se colocan unas gotas de los reactivos y se hacen flotar los cortes en acetato de uranilo durante 10 minutos. A continuación, lavar con agua destilada, pasar a solución de citrato de plomo de Reynold y dejar actuar durante 10 minutos. Volver a lavar con agua destilada y dejar secar, observar y fotografiar.

III.J.2. SOLUCIONES Y REACTIVOS

III.J.2.a. Solución de Millonig a pH 7,3

Para 600 ml:

PO ₄ H ₂ Na al 2,26 %	498	ml
NaOH al 2,52 %	129	ml
Agua bidestilada, c.s.p.	33	ml
Glucosa	3,24	g

III.J.2.b. Solución de glutaraldehído al 1,5 % en solución de Millonig

Para 100 ml:

Glutaraldehído comercial al 25 %	6	ml
Solución de Millonig a pH 7,3	94	ml

III.J.2.c. Solución de Millonig- Cl_2Ca

Preparar en el momento de su utilización agitando rápidamente:

Solución de Millonig a pH 7,3	100	ml
Cl_2Ca al 1 %	0,5	ml

III.J.2.ch. Solución de tetraóxido de osmio al 1 % en solución Millonig

Tetróxido de osmio (OsO_4)	0,1	g
Solución de Millonig a pH 7,3	10	ml

Trabajar en campana. Romper la ampolla de OsO_4 y transferir directamente los cristales a un frasco Pyrex que contenga 5 ml de solución de Millonig. Con los 5 ml restantes de dicha solución, desprender los cristales que pueden estar pegados en la ampolla.

Tomar un frasco de Pyrex de 15 ml de tapón a rosca con empaque de teflón e introducir una barra magnética. Cerrar el frasco herméticamente y poner a 4° C sobre un agitador magnético para que los cristales se disuelvan en menos de 1 hora. De esta manera, no es necesario preparar la solución el

día anterior.

III.J.2.d. Solución de citrato de plomo de Reynold

Nitrato de plomo	1,33 g
Citrato sódico, $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,76 g
NaOH 1 M	unos 8 ml
Agua destilada, c.s.p.	50 ml

Colocar el nitrato de plomo, el citrato sódico y 30 ml de agua en un frasco de 50 ml y agitar sobre agitador magnético durante 30 minutos, hasta que se produzca una conversión completa de nitrato de plomo en citrato, es decir, cuando la solución tome un aspecto blanco lechoso.

Sin dejar de agitar, añadir NaOH 1 M hasta que la solución se haga transparente y completar hasta los 50 ml con agua destilada. La solución debe quedar a pH 12. Si la solución no quedase completamente transparente, eliminar la turbidez mediante centrifugación.

III.J.2.d. Solución de agarosa al 2 %

Agarosa	2 g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Dejar embeber. Fundir al baño María y distribuir en alícuotas de 5 ml. Esterilizar en autoclave a 119° C durante 20 minutos.

III.J.2.e. Solución de Formwar

Conviene prepararla con tiempo

Formwar	40	mg
---------------	----	----

Cloroformo	20	ml
------------------	----	----

Pesar el producto en frasco hermético, añadir el cloroformo y guardar a 4° C.

III.K. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS

Vamos a exponer a continuación los procedimientos que seguimos para aislar las inmunoglobulinas del suero sanguíneo y de la membrana de las células MMT, expuestas o no a sueros humanos tóxicos para dichas células, así como de vesículas zeióticas de las mismas producidas tras algunas reacciones antígeno-anticuerpo utilizando inmunoglobulinas aisladas de los sueros humanos tóxicos.

III.K.1. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS CIRCULANTES**III.K.1.a. Aislamiento de inmunoglobulinas por precipitación con sulfato de amonio**

Recoger la sangre extraída a los ratones, conejos o personas en tubos secos y estériles, incuban a 37° C durante 20 minutos y guardarlos a 4° C hasta el día siguiente. Se recoge el suero exudado y se mide el volumen exacto, añadiendo por cada volumen de suero dos volúmenes de solución salina de Hanks

[1x], sin rojo fenol.

Añadir solución saturada de amonio a pH 7,2 para conseguir una concentración del 45 %. Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación centrifugar en tubos de cristal cónico con adaptador de goma a 4000 x G a 4° C, durante 15 minutos.

Decantar el sobrenadante y lavar la pella con abundante volumen de solución de sulfato de amonio al 45 % en agua y centrifugar en las mismas condiciones.

Decantar el sobrenadante y añadir a la pella un volumen igual al suero original de Hanks [1x]. Centrifugar de nuevo en las mismas condiciones para eliminar cualquier precipitado, y recoger el sobrenadante, añadiendo la cantidad necesaria de sulfato de amonio para conseguir una concentración final del 40 %. Agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos y centrifugar en las condiciones anteriormente indicadas.

Decantar el sobrenadante y lavar la pella en abundante volumen de sulfato de amonio al 40 % en agua. Repetir centrifugación en las mismas condiciones y decantar sobrenadante, eliminándolo al máximo escurriendo sobre papel de filtro.

La eliminación del sulfato de amonio se realiza por diálisis. Disgregar la pella en la mitad del suero con solución salina de Hanks [1x] o con cloruro de sodio isotónico.

Otra manera de eliminar los iones es la diafiltración. Se disgrega la pella en un volumen total de 7 ml, que es la

capacidad de los filtros "Amicon" Centriflo, y se transfiere a filtros de tipo 25 o 50. Centrifugar de forma que las inmunoglobulinas se concentren y diluyan varias veces en la solución salina. La eliminación total del sulfato de amonio se consigue tras 3 o 4 ciclos de concentración y dilución de material cargado en los filtros "Amicon".

Tras la eliminación del sulfato de amonio, recoger las inmunoglobulinas. Las proteínas desnaturalizadas precipitadas creadas en las maniobras se eliminan por centrifugación. La solución de inmunoglobulinas se esteriliza pasándola para la determinación de proteínas por el método de Lowry y por espectrofotometría. A pesar de que se produce cierto grado de desnaturalización, las inmunoglobulinas obtenidas con este procedimiento pueden ser utilizadas para casi todos los propósitos.

a.1. Soluciones a utilizar

a.1.1. Solución de Hanks [1x] a pH 7,2, sin rojo fenol

Solución de Hanks [10x]	10	ml
NaHCO ₃ al 1,4 %	1,1	ml
Agua bidestilada estéril, c.s.p.	90	ml

a.1.2. Solución saturada de sulfato de amonio

Sulfato de amonio	500	g
Agua bidestilada, a 40-50° C, c.s.p.	500	ml

Amoníaco concentrado hasta..... alcanzar pH 7,2

Disolver el sulfato de amonio en el agua cuando esta alcance la temperatura ambiente, y ajustar después a pH 7,2 con el amoníaco concentrado.

III.K.1.b. Aislamiento de inmunoglobulinas por cromatografía de filtración en gel de dextrano y reciclo ascendente

Mediante este método, la desnaturalización proteica es menor que con el anterior. Se base en el procedimiento descrito por Determan (1968), Fisher (1976) y Pharmacia Fine Chemicals (1979). Utilizamos un equipo de la casa LKB. Consta básicamente de un armario refrigerado donde se aloja todo el equipo, para trabajar a una temperatura de 10° C, una bomba peristáltica modelo Multiperpex, un absorciómetro ultravioleta modelo Uvicord III y un colector de fracciones modelo Ultrorac 7000.

Empleamos columnas cromatográficas de distintas capacidades, según los volúmenes de muestra, de la casa Pharmacia Fine Chemicals, disponiéndose de forma que el extremo inferior conecte a una llave de tres vías para que podamos hacer pasar el buffer requerido desde su recipiente correspondiente y el suero que procede de la jeringa acoplada para su carga. El extremo superior de la columna se conecta a la bomba peristática para mantener el flujo elegido de manera constante y hacerlo pasar a través de la celdilla de lectura de

absorciómetro; a continuación, el líquido pasa al colector de fracciones, que se puede programar para la recogida en distintas condiciones.

La columna se prepara con Sephadex G 150 superfino, un polímero de dextrano entrelazado con epiclorohidrina, con la cual forma una malla tridimensional de cadenas de polisacáridos. Una vez hidratado es estable a pH entre 2 y 10 y resistente a agentes disociantes como urea, cloruro de guanidina o detergentes con el dodecilsulfato sódico.

La cromatografía de recicló ascendente contra la gravedad tiene como ventaja impedir que el gel se apelmace, permaneciendo así sin alteraciones el flujo de la columna. El flujo puede variar según el diámetro de la columna y la presión seleccionada en la bomba peristáltica. Generalmente utilizamos columnas K-20/100 de 500 ml de capacidad.

El gel se prepara calculando el peso necesario de Sephadex G 150 superfino para que el hidratarse ocupe el volumen de la columna. Generalmente se emplearon 25 g de gel seco. Se añade aproximadamente el doble de la capacidad de la columna de buffer fosfato, se coloca al baño María durante 5 horas, se deja enfriar y se introduce en la columna. Una vez sedimentado, lavar con el mismo buffer fosfato y mantener a temperatura de 10° C hasta el momento de su utilización. Si la columna no va a ser utilizada en largos períodos de tiempo, añadir como antiséptico al buffer azuro de sodio al 0,1 %, el cual debe ser eliminado en el momento de proceder a la separación

cromatográfica, ya que interfiere en la lectura del absorciómetro. Para ello, basta lavar la columna con el mismo buffer sin el azuro de sodio.

La separación de las inmunoglobulinas del suero se facilita preparando previamente la carga, de manera que conviene inactivar el suero a 56° C durante 30 minutos y dializarlo después. Para una separación más nítida puede procederse a diafiltrar y concentrar el suero utilizando membranas Centriflo CF-50A (Amicon), lo que permite que 7 ml de suero inactivado centrifugados a 1300 x G durante 30 minutos se concentren cuatro veces o más. Añadiendo buffer de lavado al producto concentrado y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones, eliminamos gran parte de las sales, habiendo menos interferencias durante la carrera.

Para mayor pureza, se dializa la muestra frente a buffer de fosfato 0,05 M en NaCl 0,1 M, a pH 6,9.

A continuación, se procede a la carga de la columna, la elución del buffer fosfato movilizado por la bomba peristáltica, y el fraccionamiento de las proteínas séricas en una serie de tubos en el colector de fracciones. La mayor parte de las inmunoglobulinas salen en el primer ciclo, en los dos primeros picos que se solapan. Recoger las fracciones que contienen las inmunoglobulinas. Para ello se mide la absorción a las longitudes de onda de 278 nm y 257 nm simultáneamente por medio del absorciómetro acoplado al colector de fracciones. Se registran los picos de absorción y se recogen las fracciones

que tengan un índice $D.O._{278}/D.O._{257}$ mayor que 2,4. Se mancomunan y se repite el proceso dos veces más para conseguir el grado de pureza deseado. Mediante este procedimiento podemos recuperar la mayor parte de las inmunoglobulinas contenidas en el suero sin que se produzca modificación ni desnaturalización del material.

Una vez aisladas, purificadas y concentradas las inmunoglobulinas, tomar una muestra para la determinación de proteínas. Si no van a ser utilizadas en el momento, se congelan a -90°C .

En la figura 5 se puede ver el perfil del aislamiento de las inmunoglobulinas.

b.1. Buffer empleado

Buffer de fosfatos 0,05 M en NaCl 0,1 M

Solución A

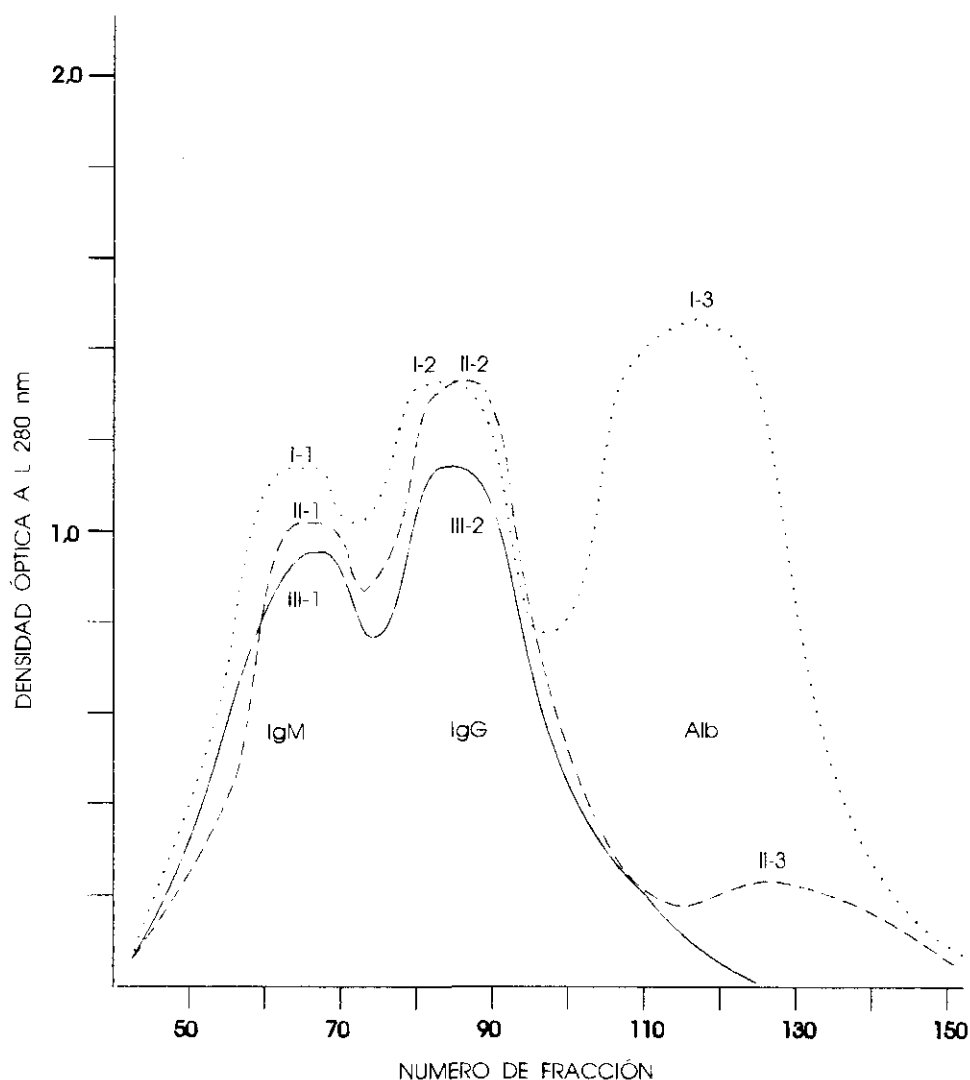
Na_2HPO_4	14,2	g
Agua tridestilada, c.s.p.	1.000	ml

Solución B

NaH_2PO_4	15,6	g
Agua tridestilada, c.s.p.	1.000	ml

Solución C

NaCl	11,7	g
Agua tridestilada, c.s.p.	1.000	ml



El procedimiento se llevó a cabo por filtración en gel a 10°C; 3 ml. de antisero concentrados a partir de un volumen original de 9 ml. se pasaron a través de una columna cromatográfica de 2,6x100 cm. que contenía Sephadex G-150 superfino. Las proteínas se eluyeron con buffer de fosfato 0,05 M en solución de NaCl 0,1 M, pH 6,9. Las medidas de densidad óptica se hicieron tomando una alícuota de cada fracción y diluyendo a 1/10 con buffer de elución. Los números romanos I, II y III indican el perfil correspondiente a cada ciclo. La electroforesis mostró que el pico I estaba compuesto por IgM, el pico 2 por IgG y el pico 3 por albúmina. La pureza de las inmunoglobulinas se demostró mediante electroforesis, inmuno-electroforesis y relación D.O. 278 nm/D.O. 251 nm. En nuestros ensayos esta relación fue de 2,8 para las inmunoglobulinas humanas y de 2,6-2,7 para las inmunoglobulinas de conejo.

Figura 5

PERFIL DE ELUCIÓN DE SEROPROTEÍNAS MEDIANTE RECICLO DISCONTINUO EN CROMATOGRÍA ASCENDENTE.

El buffer de lavado y elución se prepara con 580 ml de solución A, 400 ml de solución B y 1.000 ml de solución C.

Una vez preparada, comprobar que el pH es de 6,9. Esterilizar por filtración si no va a ser utilizada en el momento.

III.K.2. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS UNIDAS A MEMBRANAS DE CELULAS MMT

Para la elución de las inmunoglobulinas, de las células, fragmentos zeioticos o membranas plasmáticas fueron tratadas mediante el método de Ran y Witz (1970).

El procedimiento que seguimos fue el siguiente. Partiendo de las células MMT correspondientes al cultivo de un frasco de Roux, aproximadamente 30.000.000 de células, se lleva a cabo su desprendimiento con una espátula y se suspenden en un volumen de solución de NaCl 0,14 M a pH 5,6.

A continuación se centrifugan a 650 x G durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y se lava la pella con solución de NaCl 0,14 M a pH 5,6, centrifugándose de nuevo a 650 x G durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante y se añade un volumen de suero humano problema, incubándose a 37° C durante 15 minutos. Añadir un volumen igual de solución de NaCl 0,14 M a pH 5,6 e incubar de nuevo a 37° C durante 15 minutos.

Centrifugar en las mismas condiciones descritas anteriormente, decantar el sobrenadante y lavar nuevamente la

pepla. El producto resultante es el que se utiliza para la elisión de inmunoglobulinas mediante tratamiento ácido, como se describirá más adelante.

El procedimiento, en el caso de las células MMT incubadas con sueros de pacientes de cáncer de mama citotóxico para las mismas, es el siguiente. Tras el lavado de las células MMT obtenidas del frasco de Roux, se incubaron con suero problema positivo durante el tiempo establecido para que se inicie el efecto tóxico. A continuación, lavar las células tratadas en solución buffer de fosfato. Las inmunoglobulinas asociadas a la membrana se eluyeron utilizando pH ácido según el método que será descrito en el apartado siguiente.

Según el tratamiento de elución, la cantidad de proteínas aisladas varió desde aproximadamente $1,7 \mu\text{g}/1.000.000$ de células en las muestras tratadas con buffer de glicina y sacarosa $0,27 \text{ M}$ a $2,3 \mu\text{g}/1.000.000$ de células para las tratadas con buffer de glicina y sacarosa $1,49 \text{ M}$.

La valoración proteica se realizó espectrofotométricamente, aplicando la fórmula $(E_{215\text{nm}} - E_{225\text{nm}}) \times 144 \times \text{factor de dilución} = \mu\text{g/ml}$ de la solución original. Con ello vimos que las proteínas aisladas no correspondían a inmunoglobulinas puras, ya que la relación E_{278}/E_{251} fue de valores entre 1,21 y 1,47, en vez de entre 2,4 y 2,8.

Mediante inmunodifusión cualitativa se confirmó la presencia de inmunoglobulinas en las proteínas aisladas. Para ello se concentraron 100 veces los eluatos mediante membranas

Minicon B-15 y se realizó la inmunodifusión, observándose que las bandas nítidas de precipitado en las muestras de las células MMT tratadas con suero problema positivos.

III.K.3. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS MEDIANTE TRATAMIENTO ACIDO DE CELULAS

Parte de los anticuerpos que circulan por la sangre se unen a antígenos liberados por las células cancerosas, formando inmunocomplejos circulantes. Otra porción de anticuerpos se fija a los antígenos de la superficie de las células cancerosas, formando inmunocomplejos fijos.

El estudio de los inmunocomplejos fijos separando los anticuerpos de los antígenos tropezó con serias dificultades.

Las técnicas habituales recogidas de la literatura científica provocaban una elevada mortalidad celular.

Por consiguiente, antes que nada fue necesario intentar resolver este problema.

La técnica básica es la siguiente.

Se prepara una suspensión con 100.000 a 1.000.000 de células en medio esencial mínimo de Eagle suplementado con 10 % de suero de ternera. A los 30 minutos se centrifuga la suspensión a 100 x g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se añade 0,5 ml de buffer de glicina-HCl A pH 2,4 a 4° C por cada 0,1 ml de pella. Se sumerge el recipiente unos minutos en un baño de hielo (4° C) y se agita la muestra.

Se vuelve a centrifugar a 100 x G durante 5 minutos, se decanta el sobrenadante, se realiza un lavado con un volumen abundante de solución PBS de Dulbecco, se vuelve a centrifugar a 100 x G durante 5 minutos y se resuspenden de nuevo en PBS de Dulbecco. Hacer un recuento celular en un citómetro de Neubauer por el método de colorante de exclusión con eritrosina B.

III.K.3.a. Buffer empleado

Buffer de glicina-HCl a pH 2,4 con distintas concentraciones de sacarosa.

Glicina	1,25 g
Sacarosa	hasta
obtener soluciones con 92,5, 176, 300 y 510 mg/ml	
Agua tridestilada, c.s.p.	100 ml
HCl, c.s.p.	pH 2,4

La solución salina fosfatada de Dulbecco (PBS) y la solución de eritrosina B se indican en otro lugar.

III.K.4. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS DE VESICULAS ZELOTICAS DE CELULAS MMT

Suspender tres lotes de células MMT en medio de crecimiento suplementado respectivamente con 5 % de suero de ternera, 5 % de suero problema y 5 % de inmunoglobulinas aisladas del mismo suero problema. Dejar incubando durante 150 minutos, agitando

cada 15 minutos.

Recoger las suspensiones y centrifugar a 20.000 x G a 4° C durante 30 minutos. Decantar los sobrenadantes y lavar la pella resuspendiendo en 25 ml de buffer de Dulbecco a 4° C. Centrifugar en las mismas condiciones.

Decantar los sobrenadantes y resuspender la pella en 5 ml de buffer de glicina a 4° C, agitando a dicha temperatura durante 30 minutos. Centrifugar en las mismas condiciones y transferir el sobrenadante a un microconcentrador por ultrafiltración con membranas Minicon A25 "Amicon", dejando concentrar 100 veces. Añadir 5 ml de buffer de Dulbecco para eliminar el medio ácido y conseguir un pH de aproximadamente 7, y volver a concentrar 100 veces en el microconcentrador Minicon A25. Valorar el producto por inmunodifusión.

Paralelamente, lavar tres veces monocapas de cultivos de células MMT con buffer de Dulbecco. Desprender las células con espátula, resuspender en unos 25 ml de buffer de Dulbecco y centrifugar a 10.000 x G a 4° C durante 10 minutos. Decantar los tubos y resuspender las células en buffer de glicina para obtener un volumen final de 5 ml, manteniendo a 4° C durante 10 minutos. Decantar los tubos y resuspender las células en buffer de glicina para obtener un volumen final de 5 ml, manteniendo a 4° C y agitando durante 30 minutos.

Centrifugar a 20.000 x G a 4° C durante 30 minutos. Transferir el sobrenadante a una membrana de Minicon A25 y concentrar. El tratamiento a seguir a partir de ahora es el

llevado a cabo en el apartado anterior.

De la misma manera, se analizaron por inmunodifusión cualitativa las inmunoglobulinas asociadas a vesículas zeióticas de las células tratadas con suero problema positivo.

III. L. RECONOCIMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS

III.L.1. ESPECTROFOTOMETRIA Y TECNICA DE LA INMUNODIFUSIÓN DE OUCHTERLONY

La cantidad y pureza de las inmunoglobulinas elididas se analizan espectrofotométricamente haciendo un barrido entre las longitudes de onda de 220 y 350 nm y su concentración puede estimarse en la forma que se describe en el apartado II.Ñ.2.a.

Las inmunoglobulinas elididas se concentran en un microconcentrador Minicon B-15 (Amicón), que selecciona las proteínas globulares con peso molecular superior a 15.000 Da. Se añade un volumen igual al de la partida con solución buffer de fosfato 0,05 M a pH 6,9, para neutralizar el pH. Se vuelve a concentrar.

Para realizar una inmunodifusión según el método de Ouchterlony, se disponen placas de Petri de 4,5 cm de diámetro, se añaden 2,5 ml de solución de agarosa al 1 % en buffer de Owens, se deja enfriar y se perforan los pocillos para depositar los reactivos. El método se describe con detalle más adelante. Véase el apartado II.N.7.c.

III.L.1.a. Solución empleada

Solución de agarosa al 1 % en buffer de Owens

Buffer de Owens

Acetato de barbitona	16,5	g
Agua bidestilada, c.s.p.	1.000	ml

Solución de agarosa al 2 %

Agarosa	2	g
Agua bidestilada, c.s.p.	100	ml

Mezclar un volumen igual de cada solución a 60° C.

III.L.2. TECNICA DE LA INMUNOFLUORESCENCIA

Para la realización de la técnica de la inmunofluorescencia se parte de cultivos de células MMT, que se desprenden de la monocapa y se suspenden en PBS.

Las células se centrifugan a 100 x G durante 5 minutos, se lavan resuspendiendo en PBS y se sedimentan por centrifugación.

Las células se fijan con acetona pura a -20° C durante 10 minutos.

Se extienden las células sobre un portaobjetos y se secan al aire para eliminar la acetona.

Se lavan nuevamente las célula con buffer de fosfatos. Se escurre la preparación para eliminar el exceso de líquido, pero antes de que la preparación se seque se deposita sobre unas preparaciones sueros de enfermas con carcinoma mamario y sobre

otras sueros de mujeres normales.

Se incuban las preparaciones en un recipiente saturado de humedad a 37° C durante 45 minutos. A continuación se lavan dos veces con el buffer de fosfatos y se incuban con suero de conejo contra gammaglobulinas humanas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína.

Se incuban las preparaciones a 37° C en ambiente húmedo durante 45 minutos. Se lavan las células con buffer de fosfatos dos veces, se montan utilizando una mezcla de 9 parte de glicerol y 1 parte de buffer de fosfatos y se sellan con Eukit, quedando listas para su observación al microscopio.

III.L.2.a. Buffer empleado

Buffer de fosfatos, pH 7,0

NaH ₂ PO ₄ 0,2 M	80	ml
Na ₂ HPO ₄ 0,2 M	150	ml
Agua bidestilada	200	ml

III.LL. ENZIMOINMUNOANALISIS (ELISA)

La técnica de enzimoinmunoanálisis (ELISA) que utilizamos es prácticamente la descrita por Buchanan y col (1981). Es un enzimoinmunoensayo en fase sólida cuya principal ventaja es su elevada sensibilidad, del orden de la de los radioinmunoensayos.

Consiste en la fijación de los antígenos específicos, o de una mezcla que los contenga, en todos los pocillos de una microplaca y hacerlos reaccionar frente a los sobrenadantes problema y control. Sobre los anticuerpos fijados a los antígenos, hacer reaccionar un antisuero heterólogo contra las inmunoglobulinas y exponer a continuación dichas inmunoglobulinas fijadas a un conjugado estable de proteína A con fosfatasa alcalina, que se va a fijar a la fracción Fc de las mismas y que, al añadir el sustrato de la fosfatasa alcalina, da lugar a un compuesto coloreado, que absorbe a 405 nm y es proporcional a la cantidad de anticuerpos de los sobrenadantes problema y control fijados a los antígenos.

De esta manera, los mismos reactivos pueden utilizarse para valoraciones de diferentes anticuerpos; sólo hay que modificar los antígenos fijados en los pocillos de las placas, que pueden ser antígenos contenidos en células cultivadas en los mismos.

III.LL.1. SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS

III.LL.1.a. Solución de fosfatasa alcalina

a.1. Solución base

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B.D.H., Analar)	105,71 g
MgCl_2 (B.D.H.)	50,83 mg
ZnCl_2 (Merck)	3,41 mg
NaH_3 , c.s.p. (B.D.H.)	pH 7

Agua, c.s.p. 250 ml

Esta solución corresponde a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,2 M, MgCl_2 0,001 M y ZnCl_2 0,0001 M, a pH 7,0

a.2. Fosfatasa alcalina

Fosfatasa alcalina (Sigma): se suspende en el medio base hasta conseguir una concentración de 2 mg/ml. Para lavar, se añade más suspensión base.

III.1.b. Buffer de fosfatos de Sorensen, pH 7,4, para proteína A

Solución A

KH_2PO_4 (B.D.H.) 9,08 g
 Agua, c.s.p. 1.000 ml

Solución B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (B.D.H., Analar) 11,88 g
 Agua, c.s.p. 1.000 ml

Mezclar 196 ml de solución A y 804 ml de solución B. El pH a 18° C es de 7,4.

Proteína A

Se realiza una suspensión a 6 mg/ml

Proteína A	6	mg
Buffer fosfato	1	ml

III.LL.1.c. Solución de almacenamiento del conjugado**proteína A-fosfatasa**

Tris 0,05 M, MgCl_2 0,001 M, seroalbúmina 5 %. NaN_3 0,003 M

Tris base (ICN)	0,6057	g
MgCl_2 (B.D.H.)	20,33	mg
Seroalbúmina (Serva)	5	g
NaN_3 (Sigma)	19,5	mg
Agua, c.s.p.	100	ml

III.LL.1.ch. Buffer de bicarbonato a pH 9,6 para fijación de antígenos

Na_2CO_3 0,015 M, NaHCO_3 0,035 M, fenilmetilsulfonilfluoruro 100 M.

Na_2CO_3 (Merck)	0,159	g
NaHCO_3 (B.D.H.)	0,294	g
Fenilmetilsulfonilfluoruro (Sigma)	1,74	mg
Agua hervida, c.s.p.	100	ml

III.LL.1.d. Solución de NaOH 5 N**NaOH 5 N**

Esta solución se utiliza para detener la reacción.

NaOH (Merck)	20	g
Agua, c.s.p.	100	ml

III.LL.1.e. Buffer Na_2CO_3 0,5 MgCl_2 0,001 M

Na_2CO_3 (Merck)	26,5	g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (B.D.H.)	0,51	g

Agua hervida, c.s.p.	500	ml
---------------------------	-----	----

III.LL.1.f. Sustrato: p-nitrofenil fosfato con 1 mg/ml

Este reactivo se preparará en el momento de su utilización.

p-Nitrofenil fosfato (Sigma)	5	mg
Buffer Na ₂ CO ₃ a pH 10,4	5	ml

III.LL.1.g. PBS 0,15 M pH 7,2

NaCl (Merck)	8,76	g
KCl (Merck)	0,2	g
Na ₂ HPO ₄ (B.D.H., Analar)	1,15	g
KH ₂ PO ₄ (B.D.H.)	0,2	g
Agua bidestilada hervida, c.s.p.	1.000	ml

III.LL.1.h. PBS 0,15 M con seroalbúmina añ 5 % y N₃Na al 0,2 %

Esta solución se utiliza para el almacenamiento de la placa.

Seroalbúmina (Serva)	5	g
N ₃ Na (Sigma).....	0,2	g
PBS, c.s.p.	100	ml

III.LL.1.i. Solución de Glutaraldehído al 0,25 % en PBS

Glutaraldehído 25 % (Fluka)	1	ml
PBS, c.s.p.	100	ml

III.LL.2. PREPARACIÓN DEL CONJUGADO PROTEÍNA-A FOSFATASA

En tubo cónico de 2,5 ml colocar 0,75 ml de fosfatasa a razón de 2 mg/ml, añadir 1 ml de solución base para fosfatasa alcalina y centrifugar durante 10 minutos a 110 x G. Decantar y despreciar el sobrenadante, resuspendiendo la pella en 100 ml de proteína A a razón de 6 mg/ml.

Transferir la resuspensión a una membrana Centriflo CF-25, previamente saturada con glutaraldehído y lisina. Lavar el tubo con 0,9 ml de buffer fosfato y transferir a la membrana. A continuación, centrifugar durante 30 minutos a 1680 x G, repitiendo el lavado dos veces con 1 ml de buffer fosfato para eliminar iones NH_4^+ . Lavar una vez con 1 ml de glutaraldehído al 0,25 % en buffer fosfato.

Concentrar hasta 0,1 ml y agitar suavemente. Dejar a temperatura ambiente durante 2 horas, en el mismo cono. Lavar 3 veces con 1 ml de buffer fosfato cada vez, para eliminar el glutaraldehído y dejar en 1 ml.

Concentrarlo al máximo en Amicon A-75 para eliminar proteína A y fosfatasa libres y volver al volumen inicial con buffer fosfato. Tomar una muestra para valoración de proteínas por el método de Lowry y diluir en solución de almacenamiento a una concentración final de aproximadamente 210 $\mu\text{g/ml}$. Guardar a 4° C. El conjugado puede utilizarse durante los cuatro meses siguientes a su preparación.

III.LL.3. FIJACIÓN A LOS ANTÍGENOS DE LA PLACA

Se prepara una solución de antígenos con 200-400 $\mu\text{g/ml}$ de proteína en buffer $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ a pH 9,6. Si se trata de una mezcla de antígenos estructurales y solubles, repartir en dos alícuotas y solubilizar una de ellas por ultrasonidos durante 3 minutos en 6 ciclos de 30 segundos y utilizar en estos casos el buffer con fenil-metil-sulfonil-fluoruro para inhibir la actividad proteolítica acompañante.

Mancomunar ambas alícuotas y poner 100 μl en cada pocillo de la placa, dejando una fila en blanco para control de fondo de placa. Incubar durante 2 horas a 37° C, en estufa de gaseo. A continuación, pasar a 4° C y dejar durante 18 horas.

Eliminar el antígeno vaciando a fondo con micropipeta y realizar 5 lavados con PBS. Añadir a cada pocillo 400 μl de solución de PBS más seroalbúmina 5 % más N_3Na 0,2 % y guardar a 4° C hasta su utilización.

III.LL.4. VERIFICACIÓN DE LA REACCIÓN

La placa cubierta con antígenos se lava 5 veces con PBS y se añade a cada pocillo 200 μl de la solución problema, dejando pocillos para control de fondo de placa y fondo de reacción. Incubar a 37° C en ambiente de humedad durante 2 horas y eliminarlo con micropipeta.

Lavar 5 veces con PBS y añadir 100 μl de antisuero de

conejo contra inmunoglobulinas humanas o de ratón, según corresponda, preparadas en las condiciones descritas, diluídas al 1/100 con solución PBS. Incubar a 37° C en ambiente saturado de humedad durante 1 hora y quitarlo con micropipeta.

Lavar 5 veces con PBS y añadir 200 μ l de conjugado proteína A-fosfatasa diluído al 1/25 en PBS. Incubar a 37° C en ambiente saturado de humedad durante 1 hora y quitarlo con micropipeta.

Lavar 5 veces con PBS y añadir 300 μ l de sustrato con 1 mg/ml preparado en el momento. Incubar a 37° C en ambiente saturado de humedad y detener la reacción añadiendo 20 μ l de NaOH 5 N a cada pocillo.

Leer en el espectrofotómetro a λ 405 nm frente a blanco de buffer Na₂CO₃ 0,5 M, MgCl₂ 0.001 M y NaOH 5 N.

Los reactivos deben añadirse a 37° C.

El control de fondo de placa se realiza depositando solamente conjugado y sustrato.

El control de reacción se obtiene depositando anti-inmunoglobulinas, conjugado y sustrato, con o sin adición previa de inmunoglobulinas no reactivas.

III.M. OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES Y VIRUS

III.M.1. AISLAMIENTO DE MEMBRANA PLASMÁTICA Y GRADIENTE DISCONTINUO DE DENSIDAD EN SACAROSA

Para su obtención tomamos células MMT, y aplicamos el procedimiento de purificación de membrana plasmática. Consiste básicamente en preparar cultivos de dichas células en frascos Roller de 650 cm² de superficie, hipotonizar las células en buffer básico, homogeneizar y separar las fracciones enriquecidas en membrana plasmática mediante una centrifugación a velocidad baja seguida por centrifugación diferencial a alta velocidad en gradiente de sacarosa para su concentración y purificación.

Para el aislamiento de la membrana plasmática empleamos el método de Ray (1970) con algunas modificaciones.

El método consiste en aislar las células de las cuales se quiere obtener la membrana plasmática. A continuación, se lavan con un volumen grande de solución salina citrada isotónica (SSC) [1x] y se centrifugan a 300 x G durante 15 minutos. Se vuelven a lavar con solución Tris 20 mM y NaCl 0,14 M a pH 7,4. Se suspenden en un volumen igual de solución hipotónica con NaHCO₃, CaCl₂ y fenilmetil-sulfonil fluoruro a 4° C y se mantienen en condiciones hipotónicas 2 horas. A continuación se homogeneizan las células en un homogeneizador Potter de vidrio-teflón a 3.000 rpm, en ciclos de 1 minuto para evitar

calentamiento y tomar muestras.

La observación de las muestras al microscopio de contraste de fases permite controlar la homogeneización, la cual debe detenerse cuando se han roto todos los citoplasmas pero los núcleos están intactos. En este momento, se toma una muestra para determinar la cantidad de proteínas. El homogenado se centrifuga a 300 x G durante 15 minutos para sedimentar los núcleos. El sobrenadante se separa, se toma una muestra para determinación de proteínas y se centrifuga a 1.400 x G durante 15 minutos para sedimentar las membranas. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en solución hipotónica hasta un volumen final de 3,4 ml; se añaden 7,5 ml de sacarosa al 70 % (peso/volumen) y se toma muestra para determinación proteica.

Las membranas purificadas quedan así suspendidas en sacarosa al 48 % en el fondo de un tubo de ultracentrífuga. Encima de esta capa se depositan en capas superpuestas, con mucho cuidado, 9,7 ml de sacarosa al 45 %, 12 ml de sacarosa al 41 % y 2,4 ml de sacarosa al 37 % para formar un gradiente de densidades. Se centrifuga el tubo a 62.000 x G durante 120 minutos y se recoge la banda que aparece en la interfase entre las concentraciones de 41 % y 45 % de sacarosa, correspondiente a una densidad 1,16, en la que se encuentran las membranas plasmáticas purificadas.

Se mide el volumen recogido y se toma una muestra para determinar proteínas. La sacarosa y los iones de calcio se

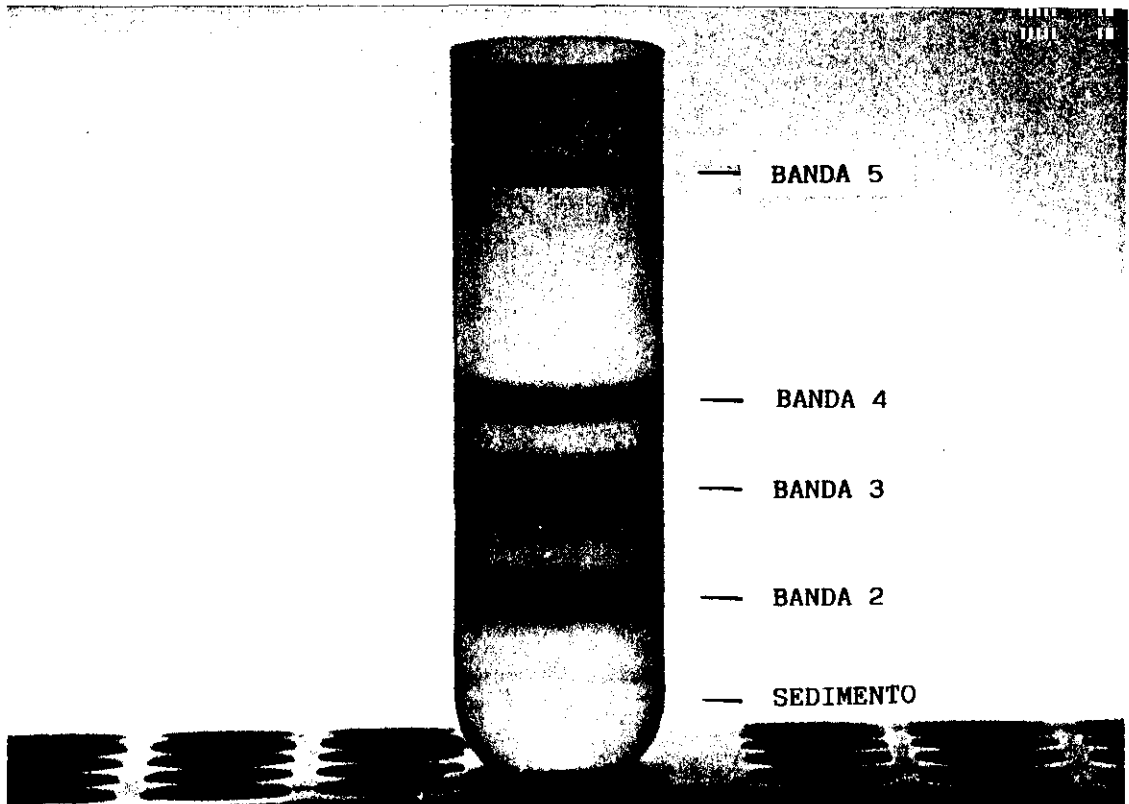


Figura 6

Tubo de gradiente de densidad de sacarosa para purificar la membrana plasmática de células MMT. En el sedimento se depositan las mitocondrias, la banda 2 corresponde a microsomas, la banda 3 a membrana plasmática, la banda 4 a lipoproteínas y la banda 5 a lípidos. Como se ve en esta figura y en las fracciones de la figura 7, la separación de la membrana es muy nítida

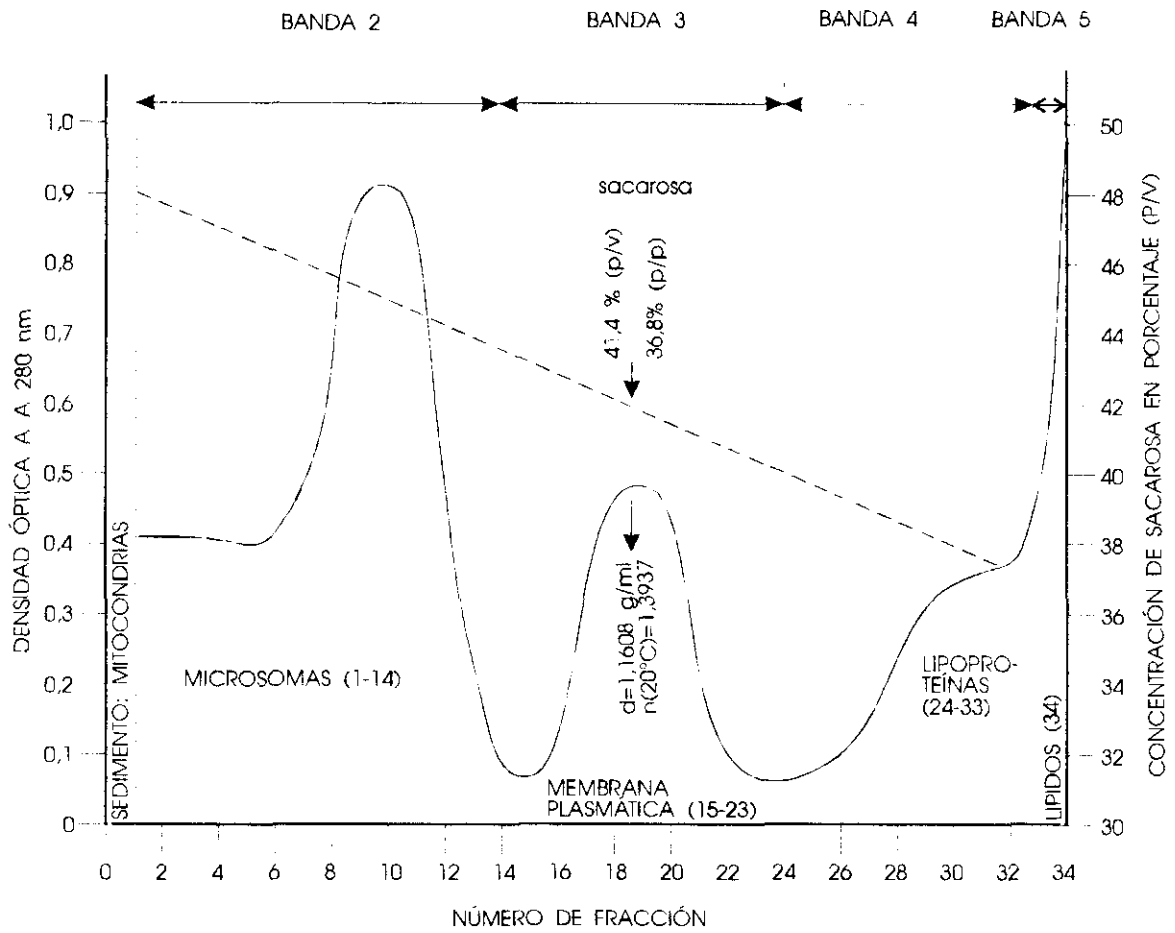


Figura 7

PERFIL DE LA PURIFICACIÓN DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS CANCEROSAS MMT POR MEDIO DE CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD DISCONTINUO DE SACAROSA AL 48-37 POR 100 (P/V), A $62.000 \times g$ DURANTE 120 MINUTOS

Superficie de cultivo en monocapa	Nº de células x 10 ⁶	A mg	B mg	C mg	A/B %	D mg
10.000 cm ²	1.808	515	327	275	63,5	5,6

A = proteínas celulares totales
 B = proteínas totales de células sin núcleo (crudo antigénico A)
 C = proteínas solubles (del citosol)
 D = membranas purificadas (banda 3)

Tabla V

Rendimiento del aislamiento y purificación de membranas de células MMT
 por cada 10.000 cm² de superficie de cultivo

eliminan lavando las membranas purificadas con volumen abundante de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y centrifugando a 24.000 x G durante 30 minutos. Se elimina el sobrenadante y las membranas lavadas y sedimentadas se congelan a -90° C hasta que vayan a ser utilizadas.

Las membranas que se van a utilizar en las inmunizaciones se solubilizan de la siguiente manera. La pella (fresca descongelada) se resuspende en una solución de NaCl 0,14 M, tris(hidroximetilaminometano) 20 mM, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo 100 µM y Triton X-100 0,05 %. Se somete a 6 ciclos de ultrasonidos de 30 segundos cada uno, se ultracentrifuga a 100.000 x G durante 60 minutos. El sobrenadante contiene las membranas purificadas solubilizadas. El sedimento se vuelve a resuspender repitiendo el proceso otras dos veces, añadiendo los sobrenadantes al y obtenido.

La cantidad de proteínas de cada sobrenadante y del mancomunado final se valora por el método de Lowry y col.

En la figura 6 se pueden ver las bandas en el tubo después de la ultracentrifugación en la figura 7 el perfil del fraccionamiento, y en la tabla V el rendimiento del procedimiento de purificación.

III.M.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE VIRUS (MMTV) DE TUMORES MAMARIOS MURINOS

III.M.2.a. Aislamiento del virus MMTV

El procedimiento seguido para el aislamiento de MMTV es el siguiente. A ratones hembras de la cepa C3H con adenocarcinoma mamario espontáneo se les administran 40 μ g de dexametasona por gramo de peso del animal, vía intraperitoneal, dos días consecutivos. Los tumores se extirpan, se fragmentan y se lavan como se hace en los cultivos primarios. Los fragmentos lavados se transfieren a un homogeneizador de Potter-Elvehjem previamente tarado y se determina su peso. Se añaden cinco volúmenes (p/v) de solución hipotónica preparada con dos volúmenes de solución salina de Hanks, con NaHCO_3 , sin rojo fenol, y un volumen de agua bidestilada, a 4° C. Se procede a la homogeneización de los fragmentos con 20-30 emboladas, controlándola con el microscopio de contraste de fases; cuando la ruptura de la membrana plasmática es total y empiezan a producirse daños en los núcleos, se interrumpe la homogeneización.

Trabajando a 4° C, el homogenado se centrifuga a 2.000 x G durante 10 minutos en centrífuga Sorvall, rotor HB4, para sedimentar los núcleos y las mitocondrias. Se recoge el sobrenadante, se somete a ultrasonidos durante 10 segundos en un desintegrador ultrasónico MSE 100, en la posición 7 μ m de

pico a pico, para dispersar los agregados de virus. A continuación se centrifuga a 4.000 x G durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante y se guarda la pella. Se toma muestra del sobrenadante para determinación proteica y valoración espectrofotométrica de nucleoproteínas y ácidos nucleicos. Las pellas se resuspenden y se vuelven a someter a tratamiento ultrasónico y se realiza centrifugación de la manera mencionada, para obtener un sedimento de partículas víricas.

Los sobrenadantes de las dos centrifugaciones se juntan, se mide su volumen y se valora la cantidad de proteínas en una muestra adecuada. El sobrenadante final se filtra a través de membranas de 0,45 μm diámetro de poro para conseguir una suspensión de virus concentrado. El producto se ultracentrifuga a 110.000 x G durante 60 minutos a 4° C, se elimina el sobrenadante y se resuspende la pella en 2 ml de solución salina equilibrada, tomando muestra para nueva determinación espectrofotométrica de nucleoproteínas y ácidos nucleicos. El producto se purifica en un gradiente de sacarosa, como se indica a continuación conservándose a -90° C en caso de no utilizarlo de inmediato.

III.M.2.b. Purificación de virus mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

En tubos de ultracentrífuga de policarbonato de pared fina, de 35 ml de capacidad, se preforma un gradiente de

sacarosa. Se preparan 15 ml de solución de sacarosa al 60 % (p/v) y 15 ml de solución de sacarosa al 10 % (p/v) para preformar el gradiente. La carga se prepara resuspendiendo 1 ml de la suspensión de virus concentrado en 3,5 ml de solución salina equilibrada que lleve 0,5 ml de sacarosa al 50 % (p/v) y se deposita cuidadosamente sobre el gradiente. Se centrifuga a $95.000 \times G$ (24.000 rpm en una ultracentrífuga preparativa IEC, modelo B60, rotor SB110) a 4° C durante 4 horas.

El gradiente obtenido se fracciona perforando el fondo del tubo y recogiendo 32 fracciones de 1 ml en tubos cónicos aforados mediante un colector de fracciones LKB, modelo Ultragrad 11300. En cada una de ellas se determina el índice de refracción y la concentración de sacarosa empleando un refractómetro de ABBE marca Zeiss. Debe tenerse cuidado de agitar las muestras antes de poner la gota en el refractómetro para homogeneizarla y medir correctamente cada fracción. Se determina también la absorción espectrofotométrica entre 260 y 280 nm de longitud de onda para calcular la cantidad de nucleoproteínas de cada fracción, lo que permite reconocer aquellas que contienen partículas víricas.

Las fracciones con virus se mancomunan y se ultracentrifugan a $100.000 \times G$ a 4° C durante 60 minutos. Se resuspenden en solución salina equilibrada y se procede a su utilización o se conservan congeladas a -90° C hasta el momento de su uso.

III.M.2.c. Soluciones empleadas

c.1. Solución de Tris 20 mM y NaCl 0,14 M a pH 7,4

Tris	2,42 g
NaCl	8,18 g
HCl 1 N	12 ml
Agua tridestilada, c.s.p.	1.000 ml

Ajustar el pH antes de completar el volumen. Esterilizar en el autoclave a 115° C durante 20 minutos.

c.2. Solución hipotónica de bicarbonato sódico y cloruro de calcio

NaHCO ₃	84	mg
CaCl ₂	294	mg
Fenilmetilsulfonilfluoruro	17,42	mg
Agua tridestilada, c.s.p.	1.000	ml

El fenilmetilsulfonilfluoruro (concentración final de 100 μ M) inhibe las proteasas y protege a las membranas de su acción. Esterilizar por filtración.

c.3. Solución de lavado de sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA-4Na)

EDTA-4Na	0,42 g
Agua tridestilada, c.s.p.	1.000 ml

Esterilizar en el autoclave a 115° C durante 20 minutos.

c.4. Soluciones de sacarosa

Las soluciones de sacarosa a las concentraciones indicadas en el lugar correspondiente se refieren en peso/volumen (p/v). Una vez preparadas se esterilizan en el autoclave a 115° C durante 20 minutos. En algunos casos se añadieron 20 mg de azuro de sodio por 100 ml de solución para evitar contaminaciones durante las manipulaciones.

III.N. TECNICAS INMUNOLOGICAS

Las condiciones de inmunización va a depender de diversos factores como animal inmunizado y antígenos utilizados (homólogos o heterólogos, purificados o semipurificados), existiendo numerosas pautas de inmunización para la obtención de antisueros con antígenos víricos (Habel y Salzman, 1969; Kurstak y Morisset, 1974; Alvarez-Rodríguez, Alvarez-Noves y Valladares, 1979).

III.N.1. INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON MEMBRANA PLASMÁTICA PURIFICADA DE CELULAS HUMANAS O DE RATÓN

Previamente a la inmunización del conejo, se sangra al mismo y se separa una muestra de suero control. Administrar a continuación 200 µg de antígeno por vía intravenosa; a partir de este momento, con intervalos de 10-15 días, se administrarán 2 mg de antígenos suspendidos en coadyuvante de Freund

completo, fraccionando la dosis total en cinco inyecciones repartidas en cada una de las patas y en la región interescapular.

Una vez terminada la inmunización se procede al sangrado del conejo, obtención de sueros y titulación de los mismos. En ocasiones, como cuando ha transcurrido un intervalo largo de tiempo desde la última administración de antígeno, conviene administrar una dosis recuerdo con 200 μ g del mismo antígeno sin coadyuvante 8 días antes del sangrado.

III.N.2. INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON ANTÍGENOS VÍRICOS

El procedimiento llevado a cabo en este caso es básicamente el mismo que el descrito en el apartado anterior. En este caso utilizamos coadyuvante de Freund completo suplementado con *Mycobacterium butiricum* para obtener una concentración final de 2 mg/ml de la bacteria.

Las suspensiones de virus (MMTV) purificados se emulsionan con un volumen igual del coadyuvante de Freund completo suplementado, de manera que al final obtengamos una concentración de proteínas víricas de 50-100 μ g/ml. Inyectamos a los conejos 0,2 ml en cada pata y en región interescapular de la manera descrita anteriormente.

Cada 3 semanas se realiza sangrado para valorar la respuesta obtenida y, si fuese necesario, administrar una dosis refuerzo en las mismas condiciones descritas en el apartado

anterior. Cuando los títulos son aceptables se procede al sangrado y obtención de los inmunosueros.

III.N.3. INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON INMUNOGLOBULINAS HUMANAS Y DE RATÓN

Se realiza una inmunización de forma muy similar a la hecha con membrana plasmática purificada. Cuando los conejos no alcanzan los títulos necesarios recibirán cada 2 semanas dosis sucesivas de antígenos desnaturalizados con alumbre de la siguiente manera.

A 10 ml de una solución con inmunoglobulinas a la concentración de 15 mg/ml se le añaden 4,5 ml de solución de bicarbonato de sodio 1 M. A continuación, y de forma lenta, se añaden 10 ml de sulfato aluminico potásico 0,2 M y se deja actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 300 x G durante 15 minutos y lavar tres veces el precipitado con solución isotónica de cloruro de sodio o con solución salina equilibrada de Hanks. Resuspender la pella en 5 ml de la solución salina elegida; este material es el que se inyecta a los conejos con respuesta baja en dosis sucesivas con intervalos de 10-15 días, 300 mg vía subcutánea, hasta conseguir la titulación máxima.

III.N.4. INMUNIZACIÓN DE RATONES

Los resultados obtenidos de la inmunización de ratones con los antígenos anteriores, administrando las mismas emulsiones y a iguales concentraciones, son muy buenos.

La vía de administración elegida en los ratones es la intraperitoneal, suministrando 0,2 ml a cada animal y repitiendo la inmunización 2-3 veces con intervalos de 10-15 días.

III.N.5. PRUEBAS DE TITULACION DE LOS INMUNOSUEROS

III.N.5.a. Prueba del anillo

Este procedimiento fue descrito por Coombs y Hell en 1968.

En un tubo se disponen 100 ml de antisuero. Añadir muy lentamente 100 μ l de suspensión con antígeno concentrado para que no se mezclen ambas soluciones, e incubar durante 30 minutos a 37° C.

Si la reacción es positiva en la interfase se observará una zona de turbidez que confirma la capacidad del antisuero para precipitar el antígeno. En este caso, se procede a la determinación de las condiciones o relaciones óptimas de precipitación.

III. N.5.b. Prueba de las relaciones óptimas

Esta prueba se realiza para determinar la proporción

óptima antígeno/anticuerpo para producir la máxima precipitación (Kabat y Mayer, 1948).

Consiste en enfrentar volúmenes constantes de una dilución baja de inmunoglobulinas o antisuero a concentraciones crecientes de antígeno en volúmenes iguales.

Las series preparadas se agitan en el momento en que se vaya a realizar la prueba, incubándose a 37° C. Cada 10 minutos se miran los tubos, registrándose el momento en que empieza a producirse turbidez, opalescencia o precipitación. Generalmente, en los tubos en que la relación antígeno/anticuerpo es óptima la precipitación es más precoz e intensa.

La cuantificación de los precipitados es la base del estudio de la interacción antígeno/anticuerpo; la representación cuantitativa de precipitación en una curva permite deducir la cantidad que interacciona de antígeno y anticuerpo, así como la valencia antigénica (Benjamin, 1977).

La curva de precipitación desarrollada por Heidelberg y Kendall (1935a, 1935b) se realiza de la siguiente manera. Las series preparadas para las relaciones óptimas se guardan a 4° C durante una noche. Los tubos se centrifugan a 3.000 x G durante 15 minutos a 4° C. Se desprecian los sobrenadantes y se resuspenden las pellas en buffer fosfato 0,15 M a pH 7,2. Centrifugar de nuevo en las mismas condiciones y determinar la cantidad de proteínas del precipitado en cada tubo. La representación gráfica de los resultados obtenidos permite

determinar el punto de equivalencia, que nos da directamente la relación óptima antígeno/anticuerpo.

III.N.5.c. Inmunodifusión

El procedimiento de inmunodifusión fue descrito por Ouchterlony en 1948 (Ouchterlony, 1970; Crowle, 1973).

Se dispone de una capa semisólida de agar o agarosa al 1 %, en la que se realizan perforaciones según distintos modelos geométricos para distribuir en dichos pocillos soluciones de antígenos y anticuerpos que al difundir en el soporte y encontrarse van a formar bandas de precipitado. De estas bandas obtenemos varios datos sobre las características de la precipitación.

Para su realización, utilizamos indistintamente portaobjetos para inmunodifusión de la marca Miles o placas de agarosa al 1 % preparadas por nosotros de la siguiente manera.

Sobre una masa horizontal, se disponen placas de Petri de 45 mm de diámetro, añadiendo a cada placa 3 ml de solución de agarosa al 1 % recién fundida al baño María. Dejar solidificar y perforar con molde de seis pocillos periféricos en los vértices de un hexágono regular y un pocillo central. Conservar las placas a 4° C hasta el momento de su utilización. Para evitar la contaminación de las placas, en algunos casos conviene añadir a la agarosa 0,2 % de azul de sodio.

Cuando la inmunodifusión se utiliza para la titulación de anticuerpos, se disponen en los pocillos periféricos diluciones

crecientes de los antisueros de factor 2 o de las soluciones de inmunoglobulinas, enfrentándolas a la solución del antígeno colocada en el pocillo central. Para pocillos de 6 mm de diámetro el volumen necesario es de 40 μ l. Las placas se guardan en cámaras de humectación saturadas con vapor de agua mediante un atomizador y papel de filtro humedecido con una bandeja de agua en la parte inferior de la cámara. Dada la facilidad de crecimiento de diversos microorganismos sobre el agar, conviene añadir a la solución acuosa de saturación de la bandeja un antiséptico para mantener condiciones de semisterilidad.

Pasadas 48-96 horas pueden observarse por iluminación indirecta las bandas de precipitado formadas. Para conservar las inmunodifusiones, proceder a su tinción.

La tinción de las inmunodifusiones se realiza de la forma siguiente. El borde de la agarosa se marca con un pincel impregnado en tinta de Polink o mediante una muesca hecha con bisturí, para no perder la referencia respecto a la posición en que se llevó a cabo la prueba. Lavar las placas con solución salina isotónica de cloruro de sodio para eliminar las proteínas no precipitadas, para lo cual se cambia la solución salina cada 60 minutos. Las placas se dejan durante toda la noche con solución salina, repitiendo al día siguiente dos nuevos lavados. A continuación, realizar un último lavado con agua destilada durante 10 minutos. Eliminar el agua y colocar la agarosa en la posición de partida. Secar la placa dejándola

a 37° C durante toda la noche a o a 60° C durante 2-3 horas.

Una vez secas las placas, se tiñen con solución de negro de amida al 0,05 % en metanol:ácido acético:agua bidestilada (4:1:5) aproximadamente durante 5 minutos, hasta que se vean aparecer las bandas. A continuación, lavar varias veces hasta arrastrar el colorante de fondo con la mezcla de metanol:ácido acético:agua bidestilada mencionada, lavar con agua destilada y secar al aire. Las bandas aparecen teñidas en color azul con nitidez, pudiendo ser conservadas indefinidamente.

III.N.5.ch. Titulación de la serotoxicidad

Se siembran microplacas de 96 pocillos de la marca Flow con las distintas células sobre las que se va a realizar el estudio, a razón de 2000 células por pocillo en los respectivos medios y condiciones de mantenimiento de cada línea celular. A las 24 horas de la siembra, lavar las células 3 veces con medio R5aI base y añadir diluciones crecientes de factor 2 de los sueros. Incubar las placas a 37° C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, realizar el recuento de las células existentes en cada pocillo; en ocasiones, es conveniente hacer un doble recuento. Para ello, añadir a cada pocillo 100 µl de solución de colorante de exclusión, tiñéndose las células supervivientes; el recuento de las células muertas se hace por observación directa en microscopio de contraste de fases equipado con gabinete de incubación a 37° C. A continuación, proceder a su fijación y tinción.

Cuando la titulación se hace sobre células que crecen en suspensión o suspensiones celulares recién obtenidas de los animales de experimentación, en el mismo tipo de placas se añaden 10.000 células por pocillo, suspendidas en 100 μ l de medio R5aI base. A continuación, añadir 100 μ l de las diluciones de factor 2 correspondientes de los sueros, incubar las placas a 37° C en ambiente de CO₂ al 5 % en aire saturado de humedad durante 2 horas, añadir el colorante de exclusión para llevar a cabo el recuento celular y proceder a fijar y teñir las placas.

III.N.5.d. Prueba de inhibición de la serotoxicidad

Determinadas las dosis serotóxicas de cada suero y en cada uno de los sistemas ensayados, elegir la dosis serotóxica 1000, o mínima dosis capaz de matar el 100 % de las células.

En microplacas de 96 pocillos limpias, enfrentar la dosis serotóxica 100 frente a concentraciones crecientes de los antígenos cuya capacidad de inhibición de la serotoxicidad se quiere valorar. Incubar a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5 % saturada de humedad durante 2 horas para que los anticuerpos presentes en el suero se fijen a las proteínas cuyo efecto inhibitorio queremos valorar.

Transferir el contenido de los pocillos en el mismo orden en que se encuentran a la placa que contiene las células diana. A continuación, seguir el procedimiento descrito para la titulación de la serotoxicidad.

III.N.5.e. Titulación de la citotoxicidad por el método de Takasugi y Klein

El método de Takasugi y Klein (1970) permite valorar la capacidad citotóxica de los linfocitos inmunizados "in vitro".

Se disponen placas de Terasaki sembradas a la razón de 500 células en 10 μ l de sus medios de cultivo respectivos, 24 horas antes, con las distintas líneas celulares seleccionadas como células diana. Para confirmar la adherencia de las células, observar las placas en contraste de fases. Decantar el medio y lavar suavemente con medio base. A continuación, añadir diluciones de factor 2 de los linfocitos, preparadas en su medio base suplementado con suero autólogo u homólogo al 20-30 % y 2-mercaptoetanol 0,00005 M:

Las suspensiones celulares se preparan sobre una placa de 12 filas de 8 pocillos, 96 pocillos totales, reservando la primera fila para linfocitos problema y la segunda para linfocitos control. En el momento de comenzar las diluciones, todos los pocillos deben contener 50 μ l del medio elegido. En el primer pocillo se depositan 50 μ l de la suspensión celular con 10.000.000 linfocitos totales, tomándose a continuación 50 μ l que se van transfiriendo pocillo a pocillo para obtener diluciones entre 1/2 y 1/128.

En el mismo orden, se transfieren 10 μ l de las suspensiones celulares a cada pocillo de las placas de Terasaki que contienen las células diana lavadas. Se incuban las placas

a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5 % en aire saturado de humedad, durante 72 horas. transcurrido este tiempo, proceder a la fijación, tinción y recuento de las células supervivientes.

Los procedimientos de fijación y tinción son similares para las placas de serotoxicidad y las placas de citotoxicidad. Se decanta el medio de cultivo y se secan las placas a 50° C durante 60 minutos. Se postfijan en metanol durante 30 minutos, se tiñen con solución Giemsa patrón diluida al décimo en buffer de Sorensen durante 20 minutos y se lavan con agua corriente hasta que no suelte colorante. Se secan al aire y se realizan los recuentos celulares.

Los estudios de citotoxicidad también pueden realizarse en microplacas de 96 pocillos, similares a las que utilizamos para la determinación de la serotoxicidad, siendo mayor el número de células necesario para este ensayo; la ventaja principal consiste en la posible determinación de los efectos tanto por recuento directo de las células supervivientes en los 96 pocillos de las microplacas como por la valoración espectrofotométrica del colorante, realizándose de la siguiente forma. Las placas fijadas se pueden teñir con solución Giemsa o con solución de negro de amida. Tras ser lavadas, se solubiliza el colorante en metanol y se procede a la lectura de la absorción espectrofotométrica a 620 nm en un equipo Multiskan, que en las condiciones del estudio equivale al número de células supervivientes.

III.Ñ. VALORACIONES BIOQUIMICAS

III.Ñ.1. VALORACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

El método de Lowry y col (1951) se basa en la reacción de las moléculas con dos o más enlaces peptídicos con el biuret, que es una solución de sulfato cúprico en medio alcalino. La presencia de reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico reduce la tirosina y el triptófano de los polipéptidos, originando una reacción coloreada.

III.Ñ.1.a. Soluciones empleadas

a.1. Solución patrón de seroalbúmina

Seroalbúmina bovina	0,1	g
Agua bidestilada, c.s.p.	500	ml

Agitar suavemente sin formar espuma. No calentar porque se desnaturalizarían las proteínas.

a.2. Solución alcalina

Na_2CO_3 anhidro	2,0	g
Tartrato de sodio y potasio	0,02	g
Solución de NaOH 0,1 N, c.s.p.	100	ml

a.3. Solución NaOH 0,1 N

NaOH	0,4	g
Agua bidestilada, c.s.p.	100	ml

a.4. Solución de sulfato de cobre

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
H_2SO_4	una gota
Agua bidestilada, c.s.p.	100 ml

a.5. Solución alcalina de cobre

Preparar en el momento.

Solución alcalina	50,0 ml
Solución de sulfato de cobre al 0,5 %	1,0 ml

a.b. Solución de Folin diluída

Reactivo de Folin-Ciocalteu	5,0 ml
Agua bidestilada, c.s.p.....	4,7 ml

III.Ñ.1.b. Elaboración de la curva patrón

Se preparan alícuotas duplicadas entre 0,05 ml y 0,5 ml de solución patrón de seroalbúmina. Se completa a 0,6 ml con agua bidestilada. También se preparan dos tubos "blancos" con 0,6 ml de agua sin seroalbúmina.

Se añade a cada tubo 3 ml de solución alcalina de cobre, se mezcla y se deja reposar 10 minutos. Añadir luego 0,3 ml de reactivo de Folin diluído, agitar y dejar en reposo una hora.

Se lee en el espectrofotómetro la densidad óptica (D.O.) a 750 nm.

La curva patrón se representa poniendo en el eje de las ordenadas la D.O. y en el eje de las abscisas la concentración de seroalbúmina. Una D.O. de 0,220 corresponde a 40 μg de seroalbúmina.

Las proteínas solubles se disuelven en agua hasta obtener una concentración entre 20 y 200 $\mu\text{g/ml}$. Las proteínas insolubles se solubilizan con NaOH 1 N, añadiendo agua bidestilada hasta obtener una concentración de NaOH 0,5 N y una concentración de proteínas entre 20 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

La valoración de proteínas a partir de muestras biológicas se realiza previa homogeneización del material, precipitación con ácido tricloroacético al 5 % en frío e hidrólisis. Los hidrolizados reciben el tratamiento indicado para las muestras de la curva patrón.

III.Ñ.2. DETERMINACIONES POR METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

Los métodos espectrofotométricos de valoración son útiles si se dispone de muestras con sustancias puras, pero no cuando el material es heterogéneo, al basarse en la absorción característica de la luz monocromática de diferente longitud de onda por cada especie molecular, que puede verse interferida por material extraño.

III.Ñ.2.a. Determinación de proteínas, inmunoglobulinas y nucleoproteínas

Para la espectrofotometría de proteínas e inmunoglobulinas se tienen en cuenta los datos de Groves y col (1968) y de Hudson y Hay (1978), y para las nucleoproteínas las de Busch y

Mauritzen (1967).

Las soluciones que contienen proteínas purificadas se valoran midiendo el coeficiente de extinción a 215 y 225 nm y aplicando la fórmula:

$$(E_{215nm} - E_{225nm}) \times 144 = \mu g \text{ de proteínas/ml}$$

En el caso de inmunoglobulinas de ratón purificadas, E_{278}/E_{251} se encuentra entre 2,4 y 2,7. a 280 nm de longitud de onda, una unidad de densidad óptica (U.D.O.) corresponde a 0,69 $\mu g/ml$:

$$1 \text{ U.D.O.}_{280nm} = 690 \mu g/ml \text{ de inmunoglobulinas.}$$

La cantidad de nucleoproteínas se calcula por su absorción a 260 y 280 nm, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$(1,45 E_{280nm} - 0,74 E_{260nm}) \times 1.000 = \mu g/ml \text{ de nucleoproteínas.}$$

IV RESULTADOS

El sistema experimental utilizado en este trabajo consistió, primero, en observar el efecto de los sueros sanguíneos de mujeres con carcinoma de mama sobre células MMT, línea establecida "in vitro" de carcinoma mamario de ratona procedente del cruce F1(C57Bl x A_f).

Los efectos observados, que relacionaban ciertos aspectos de dos sistemas heterólogos, nos llevaron a la segunda parte, que fue estudiar las reacciones humorales y celulares entre los carcinomas mamarios humano y murino.

Los resultados obtenidos se relatan en esta sección.

IV.A. EFECTO DEL SUERO SANGUINEO DE MUJERES SANAS Y CON CARCINOMA MAMARIO O SOBRE LAS CELULAS MMT

IV.A.1. SUEROS TOXICOS Y NO TOXICOS

Cuando se observó el efecto del suero sanguíneo de mujeres sanas y de pacientes con carcinoma mamario, añadiéndolo como suplemento al medio de crecimiento de las células de la línea MMT "in vitro", se encontró lo siguiente:

a) El suero sanguíneo del 57,9 % (11/19) de las pacientes mostró efectos tóxicos marcados sobre las células MMT, manifestados por degeneración y muerte celular (figura 8).

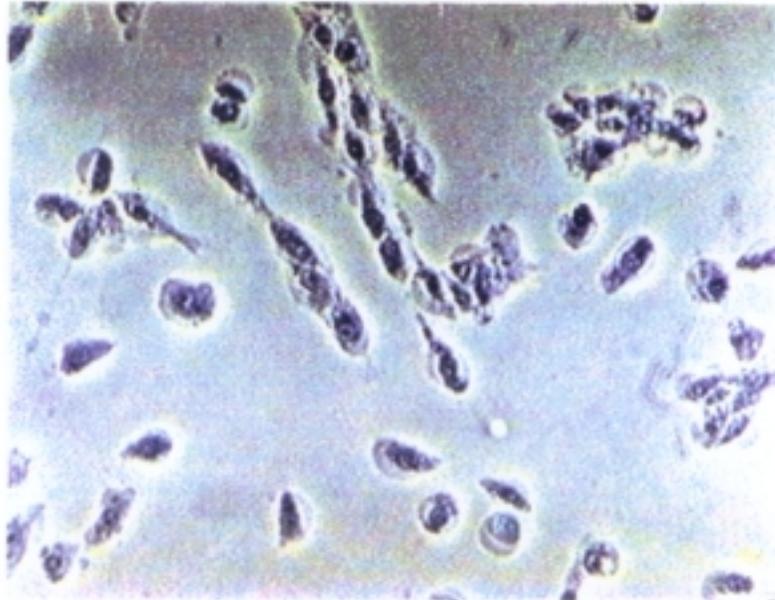


Figura 8

Efecto del suero tóxico de enfermas con cáncer de mama, SHu CaMa(+), sobre las células MMT. La células degeneran retrayéndose dejando un espacio vesicular vacío de citoplasma debajo de la membrana. Todas las células mueren.

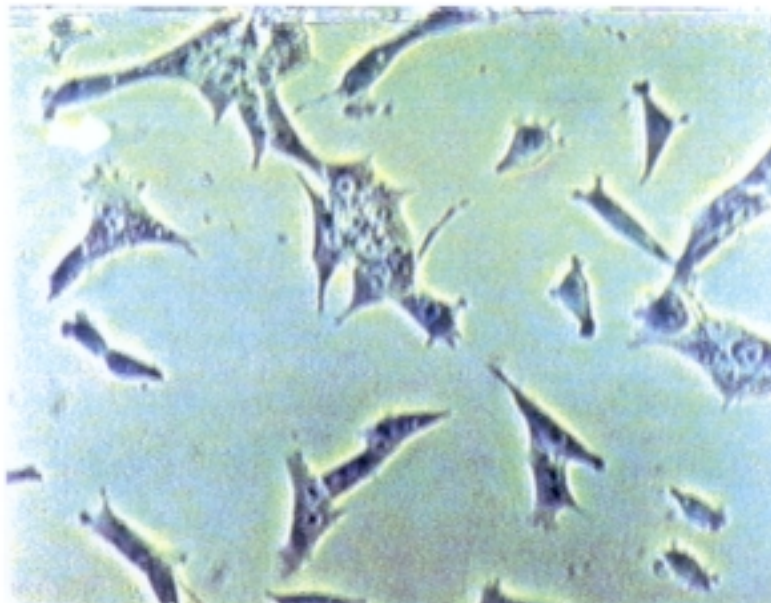


Figura 9

Células MMT que crecen en presencia de suero humano de mujeres sanas. La morfología de las células es completamente normal.

b) Sin embargo, el suero de enfermas con cáncer de mama no provocó alteraciones sobre las células no cancerosas de embrión de ratón que se utilizaron como control.

c) El 88,9 % (16/18) de los sueros de mujeres sanas no produjo efectos dañinos sobre las células MMT (figura 9). No obstante, el 11,1 % (2/18) presentó efectos tóxicos sobre las células MMT, los cuales dejaron de producirse cuando los ensayos se realizaron sobre células MMT mantenidas con 5 % de suero de ternera y 5 % de suero humano homólogo.

ch) En ningún caso se registraron alteraciones provocadas por el suero de mujeres sanas sobre las células normales de embrión de ratón que se utilizaron como control.

d) El suero de embarazadas no manifestó efectos tóxicos sobre células normales ni sobre células cancerosas MMT.

El conjunto de estas observaciones se recogen en la figura 10.

IV.A.2. OBSERVACIONES MORFODINAMICAS DE LA DEGENERACION CELULAR

Hemos podido observar detenidamente los fenómenos descritos por medio de cinefotomicrografía de intervalos en contraste de fases (figuras 11, 12 y 13)._____

Los sueros más activos producen la degeneración del 100 % de las células en menos de 20 minutos.

Los movimientos ondulantes de las membranas citoplásmicas cesan tan pronto como el suero se pone en contacto con las

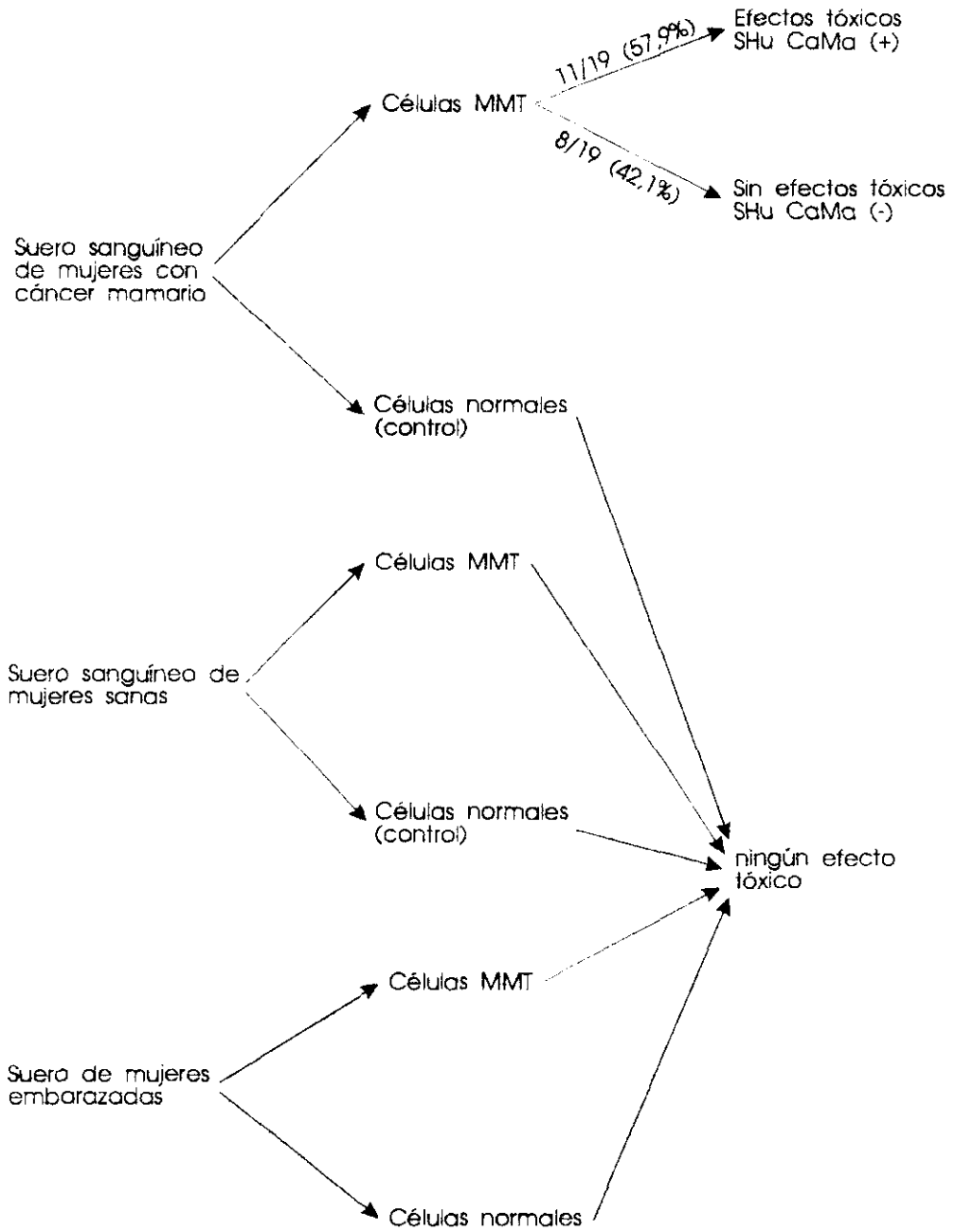


Figura 10

EFFECTO DE LOS SUEROS SANGUÍNEOS DE MUJERES CON CÁNCER DE MAMA Y MUJERES SANAS EMBARAZADAS Y NO EMBARAZADAS SOBRE LAS CÉLULAS CANCEROSAS MMT Y CÉLULAS NORMALES DE EMBRION DE RATÓN

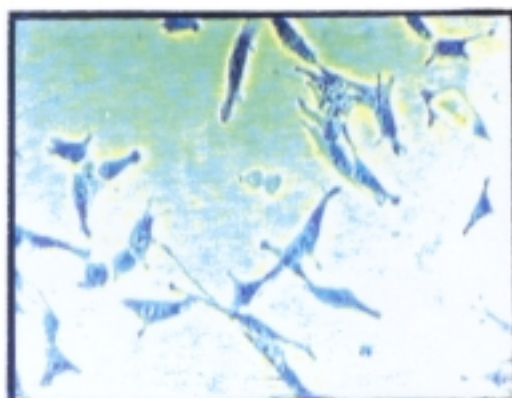


Figura 11
Antes de la adición
del suero.

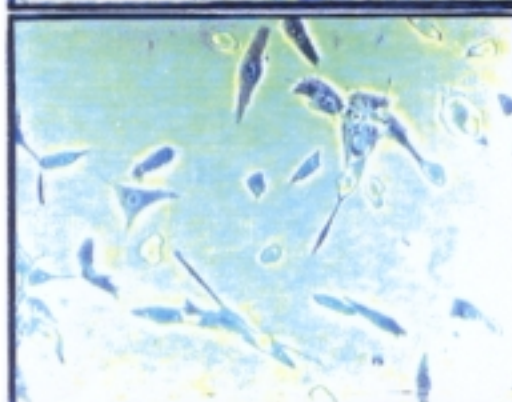


Figura 12
A los 12 minutos

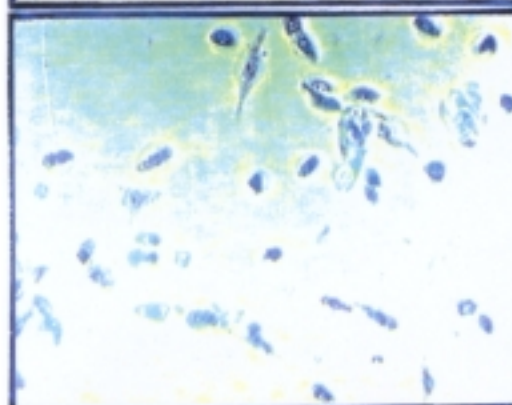


Figura 13
A los 20 minutos

Secuencia de la degeneración de las células MMT en
crecimiento
logarítmico tratadas con SHu CaMa(+)

células. Las células se separan parcialmente de la superficie a la que están adheridas, se ponen refringentes, aumentan moderadamente de volumen y mueren prácticamente todas al mismo tiempo. Las células muertas pierden la refringencia. La membrana plasmática queda separada del núcleo, orgánulos y componentes estructurales citoplásmicos por la retracción de todos ellos, dejando un espacio vesicular estructuralmente vacío.

Todos los sueros tóxicos producen el mismo tipo de degeneración, pero no todos exhiben la misma intensidad de acción.

IV.A.3. REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA ENTRE CELULAS MMT E INMUNOSUERO CONTRA INMUNOGLOBULINAS HUMANAS

Teniendo en cuenta los datos de la literatura científica, al preguntarnos sobre la causa de la actividad tóxica de los SHu CaMa(+) se pensó que pudiera tener relación con la presencia de anticuerpos citotóxicos en el suero de las enfermas.

Preparamos eritrocitos de cobaya recubiertos de inmunoglobulinas de conejo contra suero humano y estudiamos la absorción de los mismos sobre células MMT expuestas durante 15 minutos, sin dar tiempo a que los sueros tóxicos produzcan la degeneración con los resultados que pueden verse en las figuras 14 y 15.

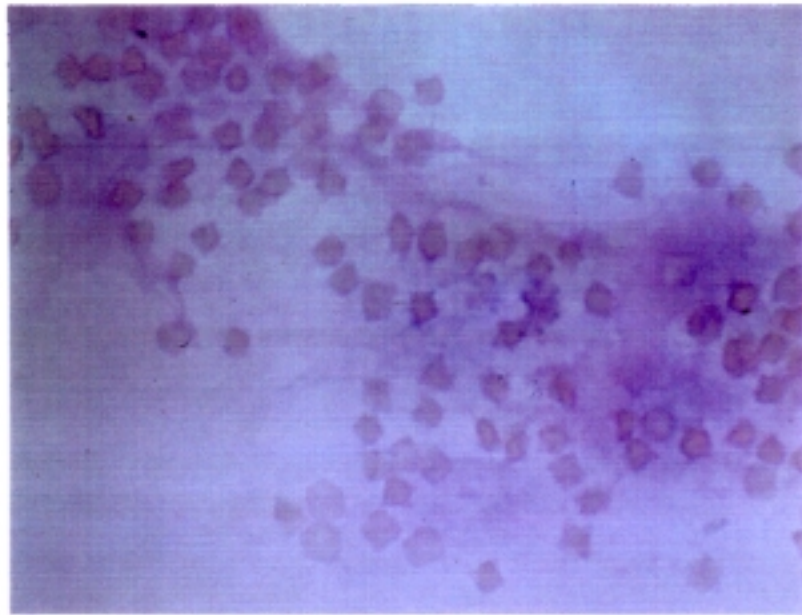


Figura 14
*Hemadsorción entre eritrocitos de cobaya recubiertos con
 inmunoglobulinas de conejo contra suero humano y las células
 MMT expuestas a SHu CaMa(+)*

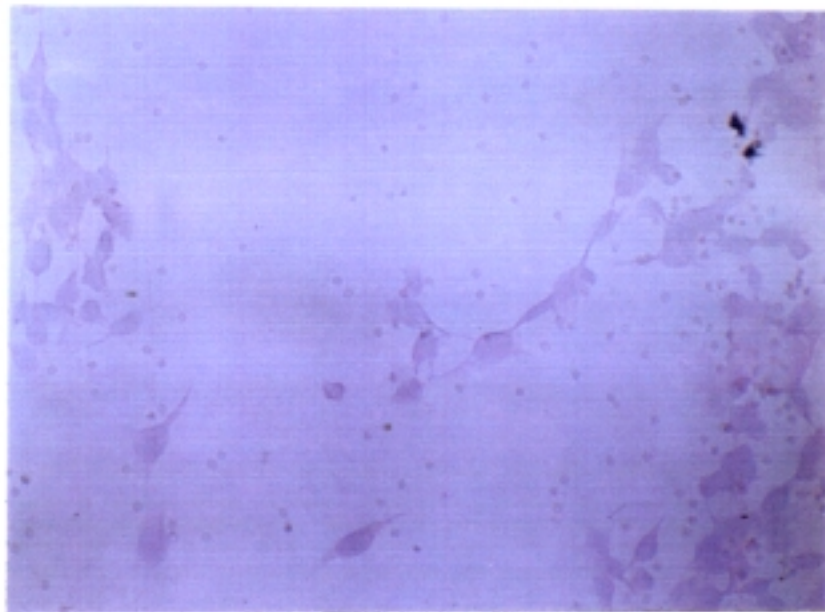


Figura 15
*Hemadsorción entre eritrocitos tratados de igual manera que
 en el caso de la figura anterior y células MMT expuestas a
 SHu CaMa(-). El mismo resultado se obtiene con suero de
 mujeres sanas.*

Para confirmar estas observaciones se utilizó el método de la inmunofluorescencia.

Para ello, las células MMT se fijaron con acetona, se incubaron con los distintos sueros sanguíneos y a continuación se lavaron para eliminar el material no fijado.

Se encontró que las células MMT mostraban una intensa fluorescencia cuando habían sido expuestas al suero sanguíneo de mujeres con carcinoma de mama; dicha fluorescencia a se observó, tanto en el citoplasma como en la membrana, por fijación a los antígenos celulares del antisuero contra inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína (figura 16).

Este efecto lo presentaron el 68,4 % (13/19) de los sueros de las enfermas que se ensayaron, correspondiendo a todos los sueros que mostraban efectos citotóxicos (11/11), SHu CaMa(+) y al 25 % (2/8) de las pacientes SHu CaMa(-). Por lo que respecto a los sueros de las mujeres sanas que sirvieron como control, solamente el 4 % (1/25 dio inmunofluorescencia positiva.

La absorción del SHu CaMa(+) con células MMT, suspendiendo 1×10^6 células vivas enteras por ml del medio suplementado con 10 % de suero problema, seguida de separación de las células por suave centrifugación a 100 x G durante 5 minutos eliminaba las propiedades citotóxicas.

Igualmente, el SHu CaMa(+) absorbido con células MMT, convertía en negativa la inmunofluorescencia (figura 17 y 17 bis).

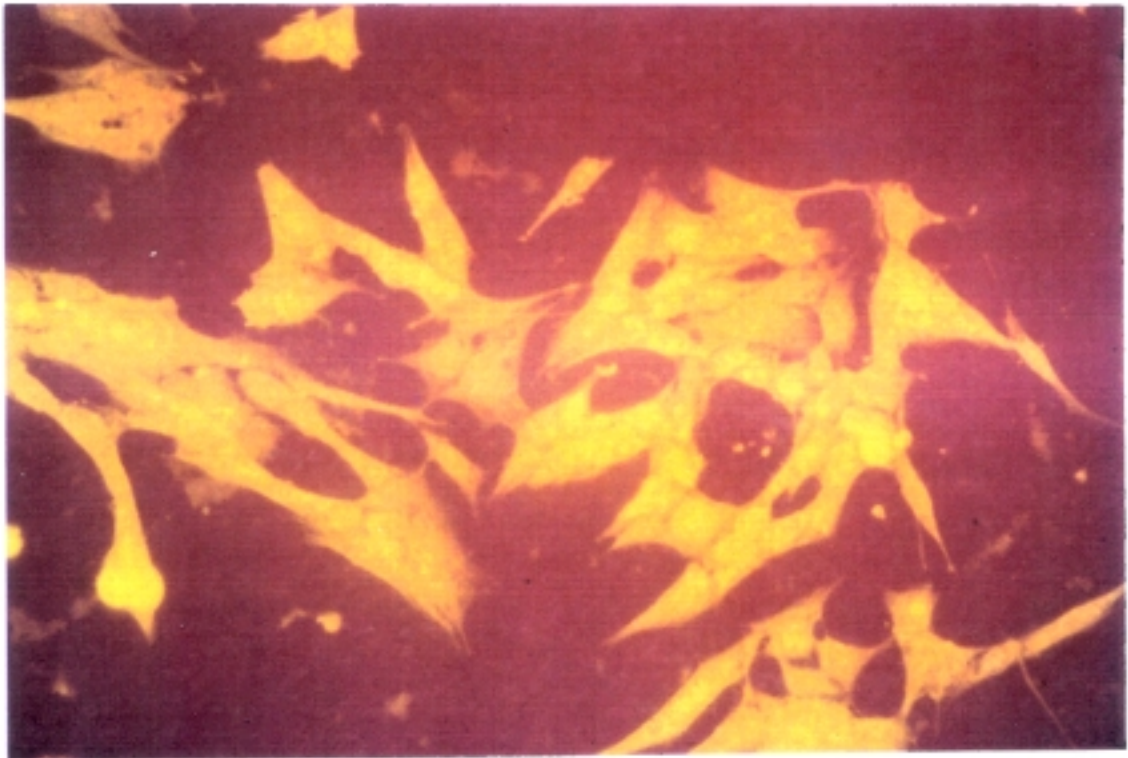


Figura 16

Resultado de la inmunofluorescencia realizada sobre células MMT expuestas a SHu(+). La reacción es positiva a nivel de la membrana y el citoplasma. Aumento 200x.

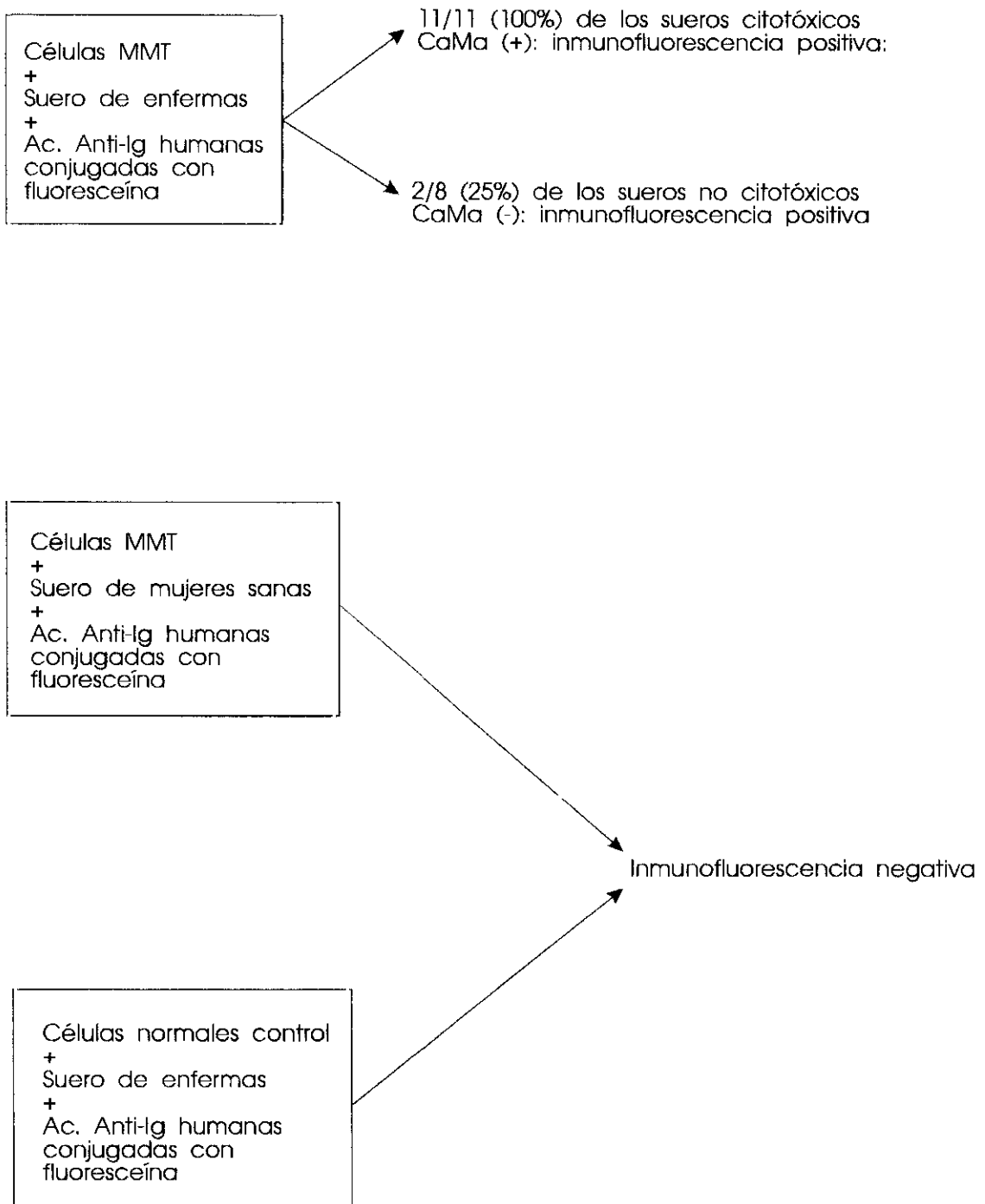


Figura 17

EFFECTO DE LOS SUEROS SANGUÍNEOS DE MUJERES CON CÁNCER DE MAMA Y MUJERES SANAS SOBRE LAS CÉLULAS MMT EN LAS REACCIONES DE INMUNOFUORESCENCIA

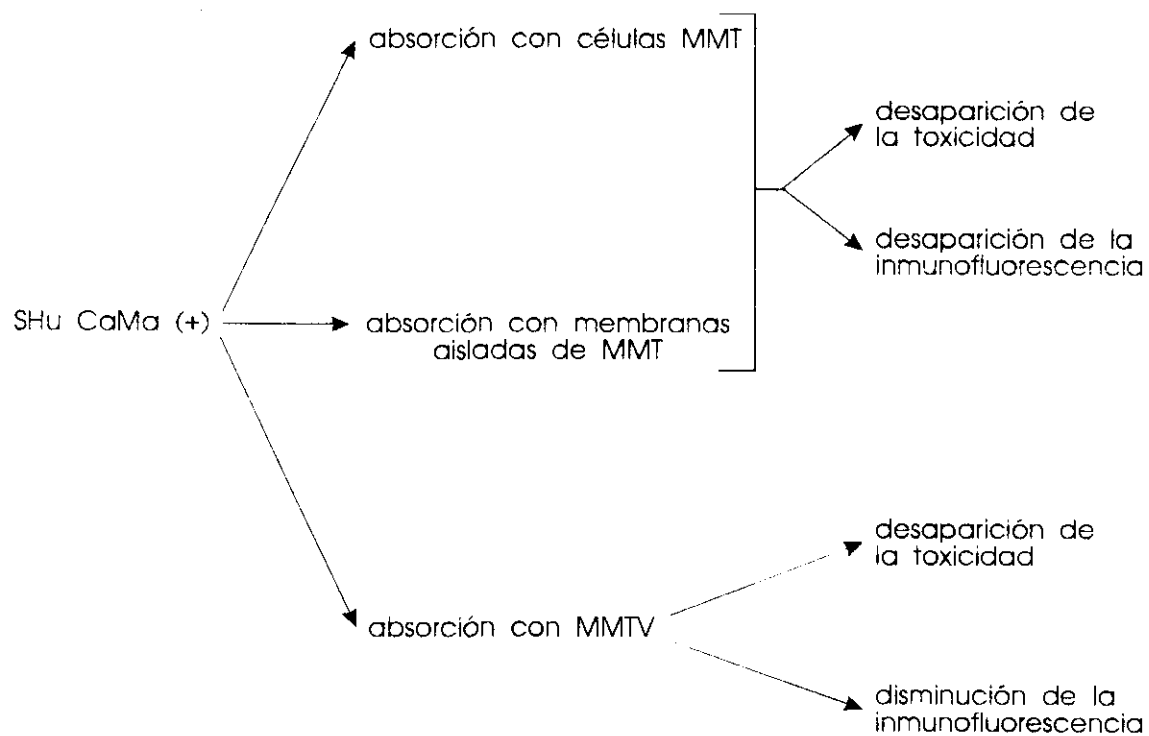


Figura 17bis

EFFECTO DE LA ABSORCIÓN DEL SHu CaMa (+) CON CÉLULAS MMT, MEMBRANAS PURIFICADAS DE LAS MISMAS Y MMTV

Estudiamos entonces la capacidad de las membranas de las células de adenocarcinoma mamario murino y de células normales de embrión de ratón para inhibir la serotoxicidad, con los resultados que pueden verse en la figura 18 y la tabla VI.

Por lo tanto, cabe hablar de:

a) sueros humanos de pacientes con carcinoma mamario con acción tóxica sobre las células MMT de carcinoma mamario murino, o SHu CaMa(+), y

b) sueros humanos de pacientes con carcinoma mamario sin acción tóxica sobre las células MMT de carcinoma mamario murino o SHu CaMa(-).

Demostrado por:

a) Serotoxicidad del SHu CaMa(+), sobre células MMT vivas.

b) Reacción de inmunofluorescencia positiva en las células fijadas, incubadas con SHu CaMa(+) y tratadas con anticuerpos anti-Ig humanas conjugados con fluoresceína.

c) La absorción del SHu CaMa(+) con células de carcinoma mamario de la línea MMT o de tumores mamarios de la cepa C3H, o con membranas purificadas de las mismas, elimina los efectos tóxicos.

ch) El efecto tóxico no desaparece absorbiendo con membranas de células normales.

d) La absorción del SHu CaMa(+) con células MMT produce una inmunofluorescencia negativa.

En los casos c y d era evidente que el cambio se debía a la eliminación por absorción de los anticuerpos con los

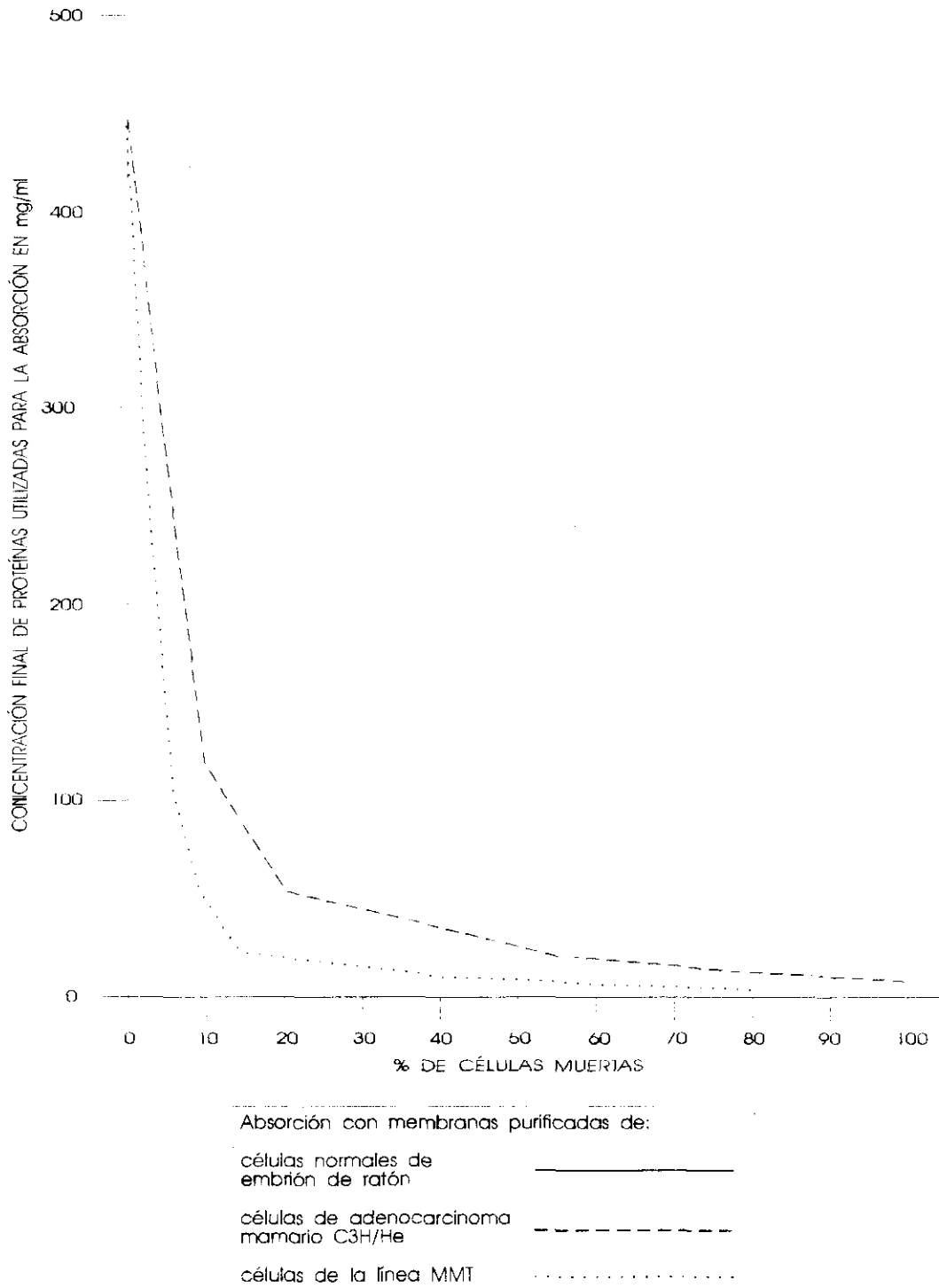


Figura 18

INHIBICIÓN DE LA SEROTOXICIDAD DE LA PACIENTE EC SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO CH3/He TRAS LA ABSORCIÓN DEL SUERO CON MEMBRANAS PURIFICADAS

Proteínas utilizadas para absorber	DI ₅₀ en µg/ml*
Membranas purificadas:	
- de células normales de ratón	265
- de células de cáncer mamario murino C3H/He	4
- de células de cáncer mamario murino MMT	22
Virus del tumor mamario murino (MMTV)	600

* Dosis inhibitoria 50 o concentración necesaria de proteínas para proteger del efecto tóxico al 50% de las células, en este caso células MMT

Tabla VI

Inhibición de la serotoxicidad del SHu CaMa (+) de la misma paciente de la figura 18, sobre células MMT tras la absorción del suero con membranas purificadas de células cancerosas y con MMTV.

antígenos celulares correspondientes.

Estos datos se resumen en la figura 19.

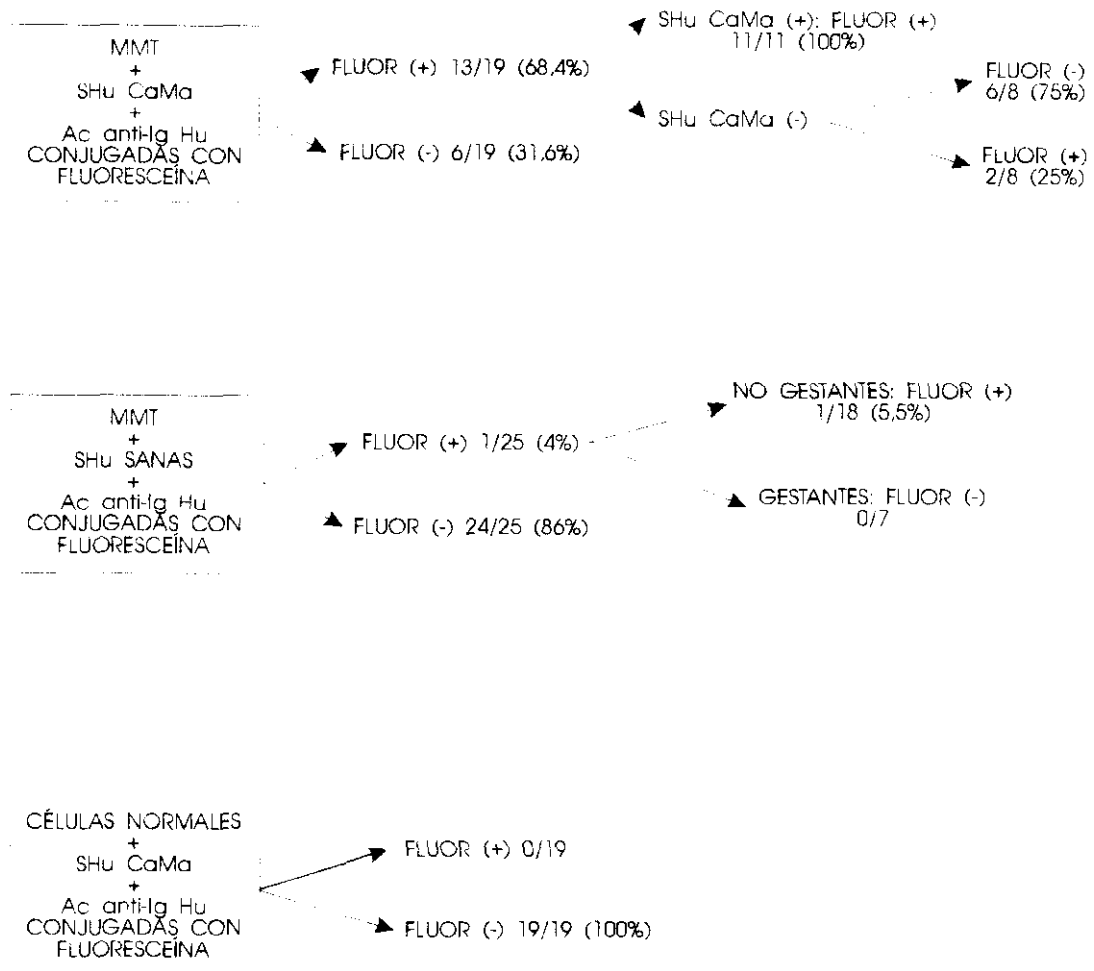
IV.B. EFECTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS DE SHu CaMa(+) SOBRE LAS CELULAS MMT

Al observar los fenómenos reseñados para los sueros enteros, verosímilmente atribuibles a anticuerpos, quisimos comprobar la actividad de los las inmunoglobulinas puras que contienen los anticuerpos puros presentes en el SHu CaMa(+) frente a las células MMT.

Nos encontramos con que aunque el suero sanguíneo total, SHu CaMa(+), era tóxico para las células cancerosas MMT, las inmunoglobulinas aisladas de las SHu CaMa(+) no eran tóxicas.

En efecto, cuando se aislaron inmunoglobulinas de los SHu CaMa(+) y se añadieron al medio de cultivo de las células MMT en una cantidad equivalente a la que se encuentra en el volumen de suero que se añade a los cultivos (10 % del medio de crecimiento), se registraron cambios de la morfología celular y liberación de fragmentos zeióticos. No obstante, las células MMT no degeneraban ni morían y acababan recuperándose, evolucionando a continuación como un cultivo normal.

Ante este efecto de las inmunoglobulinas séricas quisimos ver el efecto que producía la fracción de las inmunoglobulinas que se fijaban a los antígenos correspondientes de la membrana de las células MMT. Para ello intentamos recuperar las



MMT= Células de la línea MMT, de adenocarcinoma mamario murino

SHu CaMa= suero de enfermas con cáncer de mama

SHu CaMa (+)= suero de enfermas con cáncer de mama que tiene efecto tóxico sobre las células MMT (ver figura 11)

SHu CaMa (-)= suero de enfermas con cáncer de mama que no muestra efecto tóxico sobre las células MMT (ver figura 11)

SHu= suero humano

Ac= anticuerpos

Ig Hu= inmunoglobulinas humanas

FLUOR (+)= reacción de inmunofluoresceína positiva

FLUOR (-)= reacción de inmunofluoresceína negativa

Las células normales utilizadas son células embrionarias de ratón.

En las cantidades con barra, la primera parte corresponde a las mujeres que presentaron el efecto correspondiente indicado y la segunda parte al número de mujeres estudiadas en cada caso. Entre paréntesis se pone el correspondiente porcentaje de respuesta.

Figura 19

EFFECTO DE LOS SUEROS SANGUÍNEOS DE MUJERES SANAS Y CON CARCINOMA DUCTAL INFLTRANTE DE MAMA SOBRE CELULAS MMT EN LAS REACCIONES DE INMUNOFUORESCENCIA

inmunoglobulinas de la membrana de las células MMT por el método de Ran y Witz. En la figura 20 se observa el resultado de la inmunodifusión cualitativa.

En esta etapa se nos presentaron serias dificultades, que solucionamos como se indica en el siguiente apartado.

En efecto, cuando se aplicaba el método generalmente utilizado en la literatura para elidir las inmunoglobulinas asociadas a membrana en buffer isotónico a pH ácido a suspensiones de células vivas se producía una rápida muerte celular.

Esto supone una limitación porque, por una parte, las inmunoglobulinas elididas se mezclan con enzimas proteolíticas liberadas por las células muertas, que pueden producir importantes modificaciones en su actividad y, por otra parte, es de interés poder disponer de poblaciones vivas de células tumorales humanas en las que se hayan eluido inmunoglobulinas asociadas a su superficie para poder estudiar el comportamiento de las células sometidas a la elución, como, por ejemplo, las posibles reacciones de las inmunoglobulinas elididas de otros sistemas.

Tras diversos ensayos para intentar separar las inmunoglobulinas fijadas por los antígenos celulares conservando la máxima viabilidad celular, llegamos a uno valedero.

La figura 21 y la tabla VII recogen los resultados obtenidos tras estudiar el efecto de las modificaciones de la

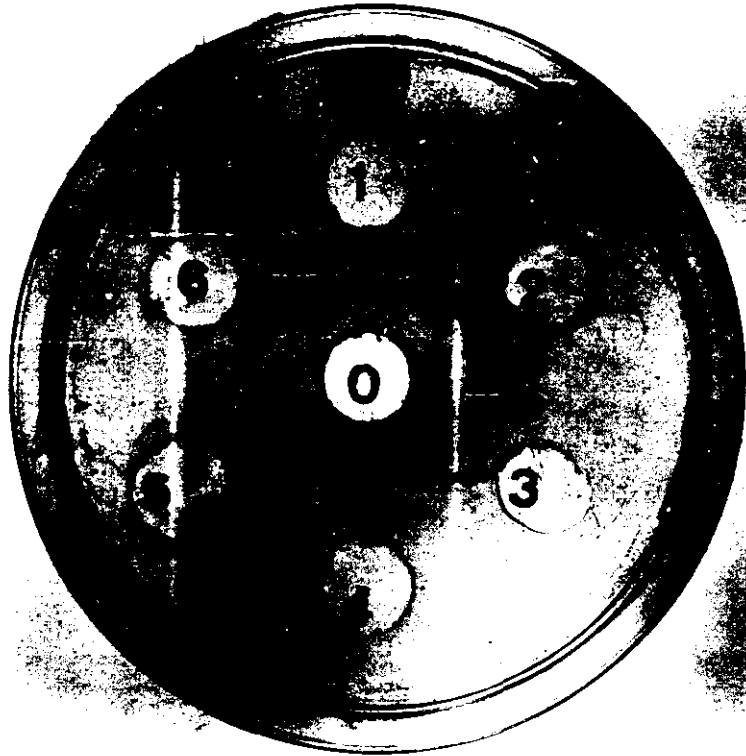


Figura 20

Inmunodifusión cualitativa de proteínas eluidas de membranas y de vesículas zeioticas.

- 0: Antisuero de conejo contra inmunoglobulinas humanas G, A y M.
- 1: Suero humano control diluido 1/20.
- 2: Proteínas eluidas de células MMT tratadas con suero humano tóxico utilizando buffer de glicina y sacarosa 1,49 M.
- 3: Proteínas eluidas de células MMT tratadas con suero humano.
- 4: Suero humano control diluido 1/20.
- 5: Proteínas eluidas de vesículas zeioticas liberadas por las células MMT tratadas con suero humano tóxico utilizando buffer de glicina y sacarosa 0,27 M.
- 6: Proteínas eluidas de célula MMT tratadas con suero humano tóxico utilizando buffer de glicina y sacarosa 0,27 M.

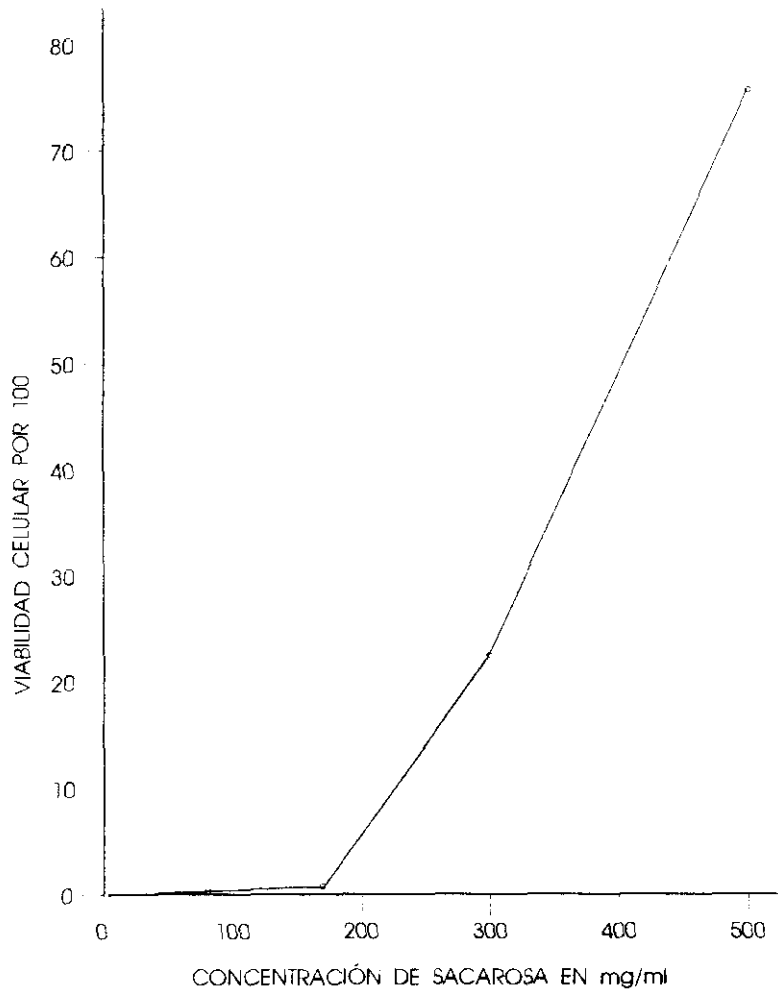


Figura 21

VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MMT EN BUFFER DE GLICINA-HCl EN FUNCIÓN DE
CONCENTRACIONES CRECIENTES DE SACAROSA

mg/ml	92,5	176	300	510
molaridad	0,27	0,51	0,88	1,49
Viabilidad	0	1	2	72
x 100 en	0	0	20	77
diversos	0	3	22	70
ensayos	0	0,5	-	66

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

X	0	1,12	21	72
σ	0	1	1	3,6

Tabla VII

Viabilidad de las células MMT a los 9 minutos de tratamiento con buffer ácido de glicina-HCl y concentraciones variables de sacarosa

tonicidad del buffer ácido utilizando concentraciones crecientes de sacarosa, para poder disponer de un procedimiento que permita elidir las inmunoglobulinas asociadas a membrana compatible con la mayor viabilidad celular posible.

Los resultados del estudio de la mortalidad celular producida en el tiempo con tratamientos a pH 2,4 con distintas concentraciones de sacarosa pueden verse en la figura 22 y en las tablas VIII, IX. Así mismo, el estudio de la viabilidad a largo plazo de las células sometidas a tratamiento ácido en medio hipertónico de sacarosa 1,49 M, comparando su curva de crecimiento con la de las células sin tratar, puede verse reflejado en la figura 23.

El procedimiento detallado para el aislamiento de inmunoglobulinas humanas fijadas a las membranas de las células MMT y el tratamiento ácido en buffer de glicina-HCl a pH 2,4 en sacarosa hipertónica 1,49 M se describe en el capítulo de "Material y Métodos".

Las inmunoglobulinas fijadas a los antígenos de la superficie de la membrana celular de las células MMT tras su exposición a las SHu CaMa(+), aisladas de la misma y ensayados sobre cultivos de células MMT, tuvieron el mismo efecto que las inmunoglobulinas séricas, o sea, produjeron cambios morfológicos iniciales, fenómenos zeióticos y recuperación final de la colonia (figura 24).

Se hicieron algunos experimentos complementarios.

Cuando las células MMT que sufren los efectos zeióticos

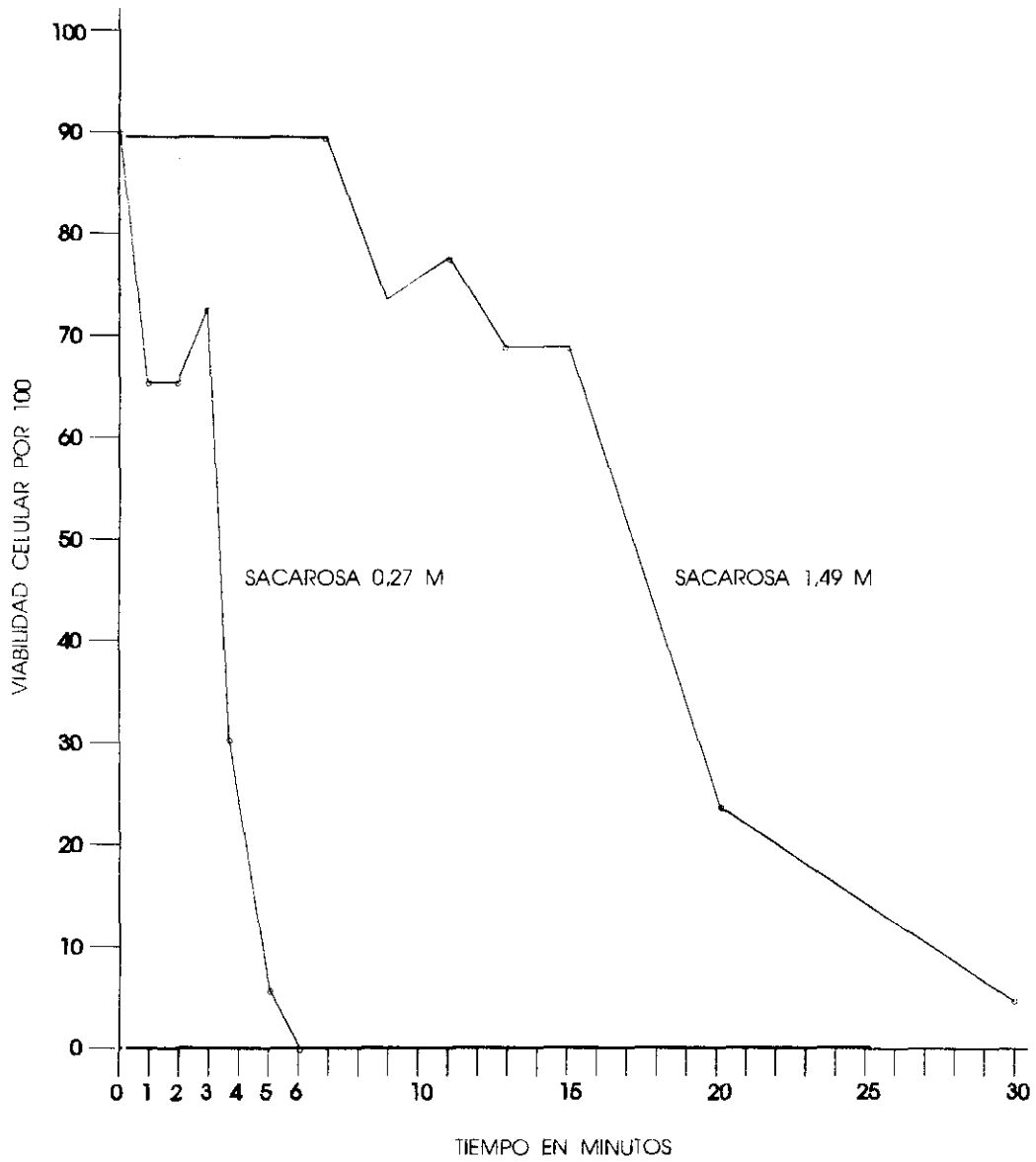


Figura 22

VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS MMT EN BUFFER DE GLICINA Y SACAROSA 0.27 M Y 1.49 M EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Tiempo de acción del buffer en minutos	Porcentaje de viabilidad*
1	65 \pm 3,2
2	65,25 \pm 4,7
3	72,75 \pm 6,3
4	31,5 \pm 5,0
5	6,5 \pm 0,5
6	0

*Resultados de cuatro ensayos

A los cuatro minutos ya solamente el 31,5% de las células están vivas y a los 6 minutos todas han muerto.

Tabla VIII

Viabilidad de las células MMT con buffer ácido de glicina-HCl y sacarosa 0,27 M en función del tiempo.

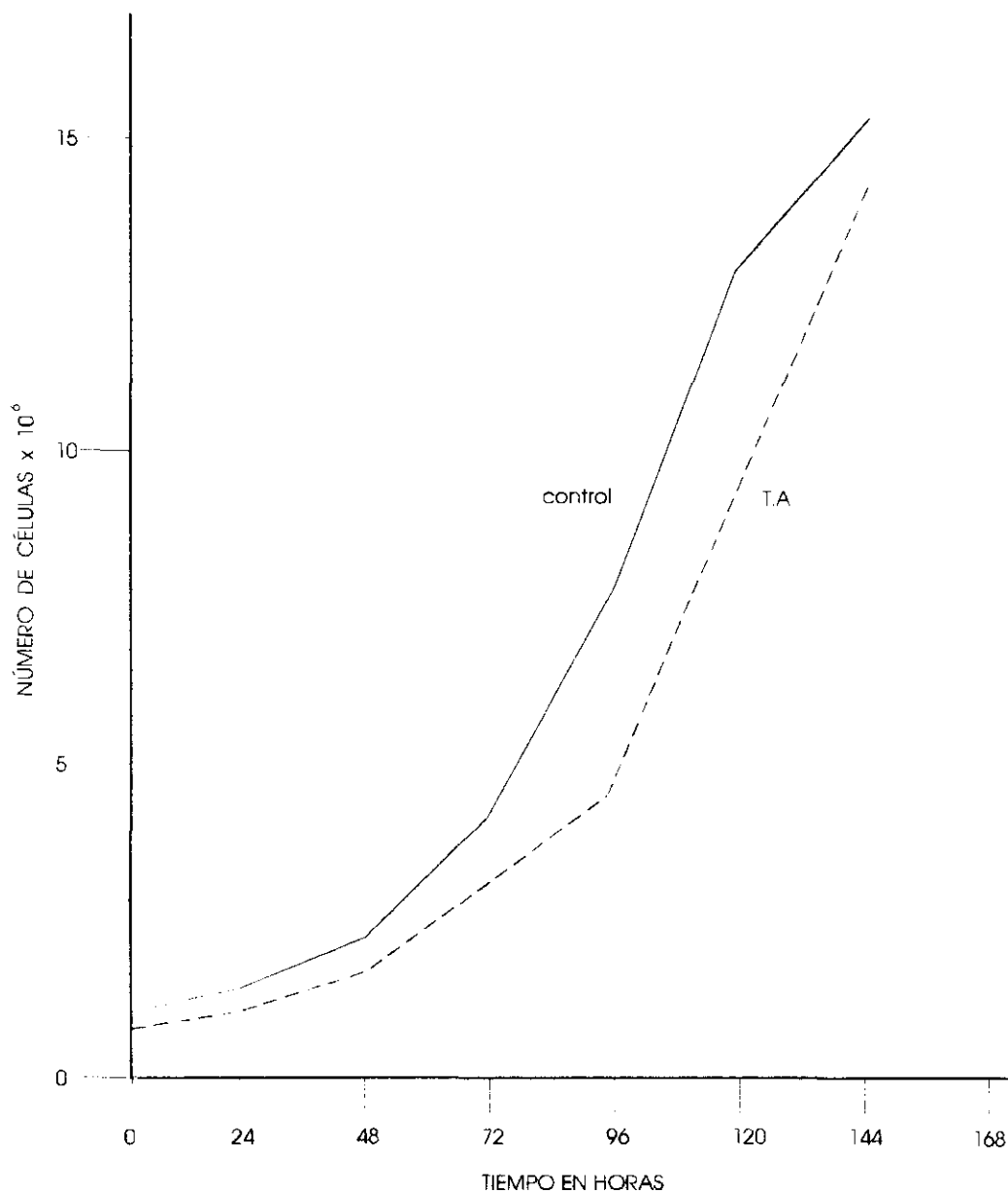
Tiempo de acción del buffer en minutos	Porcentaje de viabilidad*
7	90 \pm 2
9	72 \pm 3,6
11	74 \pm 6,2
13	68 \pm 8
15	69 \pm 7,2
20	22 \pm 6,5
30	5 \pm 2,2

*Resultado de nueve ensayos

A los 7 minutos el 90% de las células permanecen vivas y a los 15 minutos el 69%

Tabla IX

Viabilidad de las células MMT con buffer ácido de glicina-HCl sacarosa 1,49 M en función del tiempo



Control: curva de crecimiento de las células MMT sembradas sin tratamiento previo.

T.A.: curva de crecimiento de las células MMT sembradas después del tratamiento con buffer glicina-sacarosa 1,49 M, durante 10 minutos.

Figura 23

CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MMT Y EFECTO DEL TRATAMIENTO CON BUFFER ÁCIDO DE GLICINA-HCl Y SACAROSA 1,49 M DURANTE 10 MINUTOS

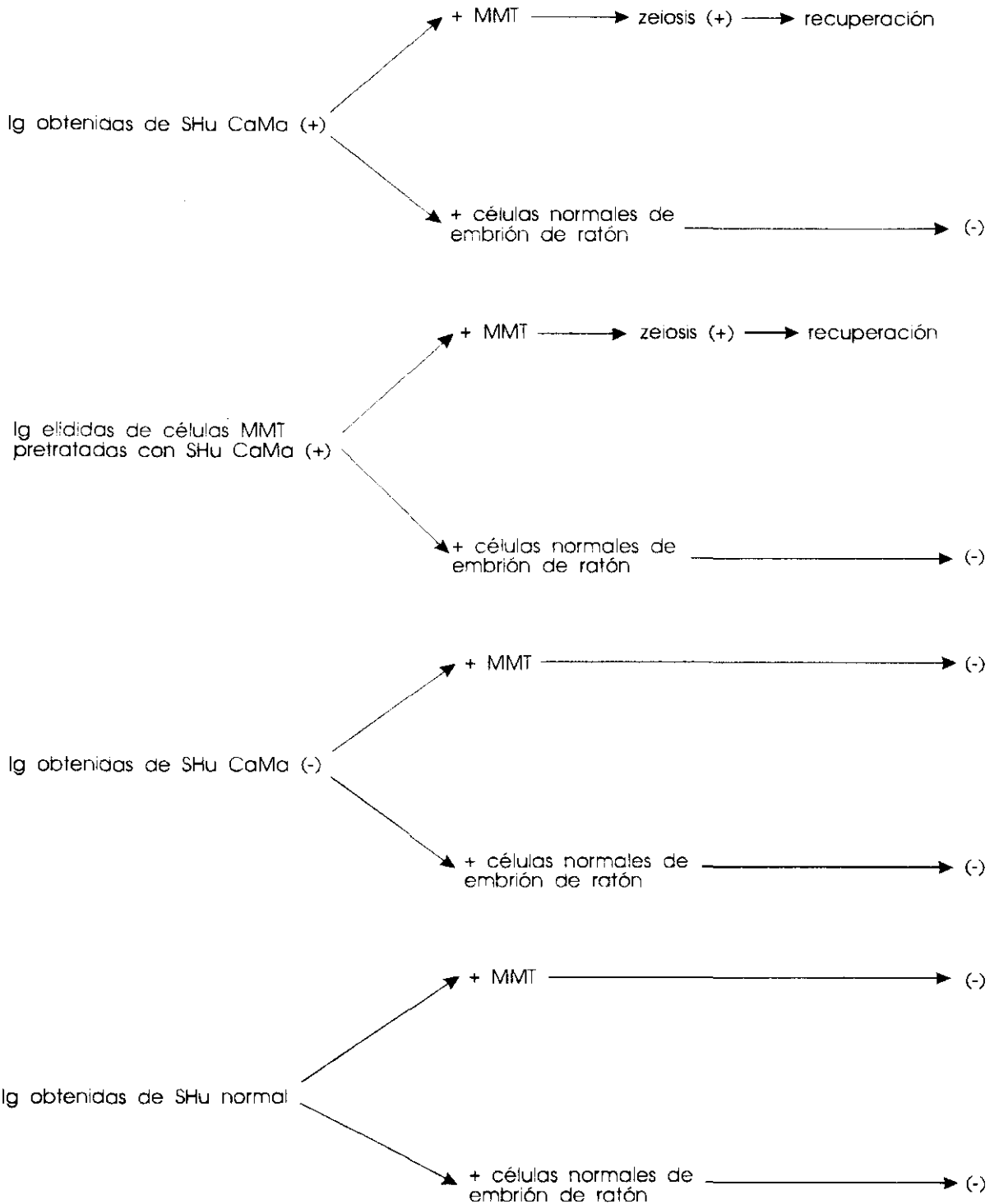


Figura 24

EFFECTO DE LAS INMUNOGLOBULINAS (Ig) OBTENIDAS DE LOS SUEROS SANGUÍNEOS Y DE LAS AISLADAS DE CÉLULAS MMT PREVIAMENTE TRATADAS CON SHu CaMa (+)

seguidos de recuperación se regeneran, el tratamiento inmediato con SHu CaMa(+) no manifiesta efectos tóxicos y el tratamiento inmediato con inmunoglobulinas no produce zeiosis.

Cuando las células recuperadas tras la zeiosis se dejan evolucionar o se subcultivan, el efecto tóxico del SHu CaMa(+) y el efecto zeiótico de las inmunoglobulinas se reproduce. (figura 25)._____

Verosímilmente, tras la elisión a pH ácido hay una pérdida tumoral de antígenos con los fragmentos zeióticos, que vuelven a producirse pocas horas después en las células que se cultivan en las condiciones estándar.

IV.C. SUEROS DE MUJERES CON CANCER DE MAMA CON EFECTO DE DIFERENCIACION GLANDULAR MAMARIA

IV.C.1. OBSERVACION DEL EFECTO DE DIFERENCIACION CELULAR

Los SHu CaMa(-) manifestaron efectos muy peculiares.

Cuando las células MMT se cultivaron con medio suplementado con SHu CaMa(-) se produjeron en pocos días, en el 75 % (6/8) de los casos, cambios morfológicos compatibles con diferenciación celular, ya que las células se agregaron formando acúmulos de aspecto glandular.

Analizando otros tipos de sueros observamos que, al igual que los SHu CaMa(-), la totalidad de los sueros sanguíneos de mujeres embarazadas (7/7)) producían los efectos descritos pero

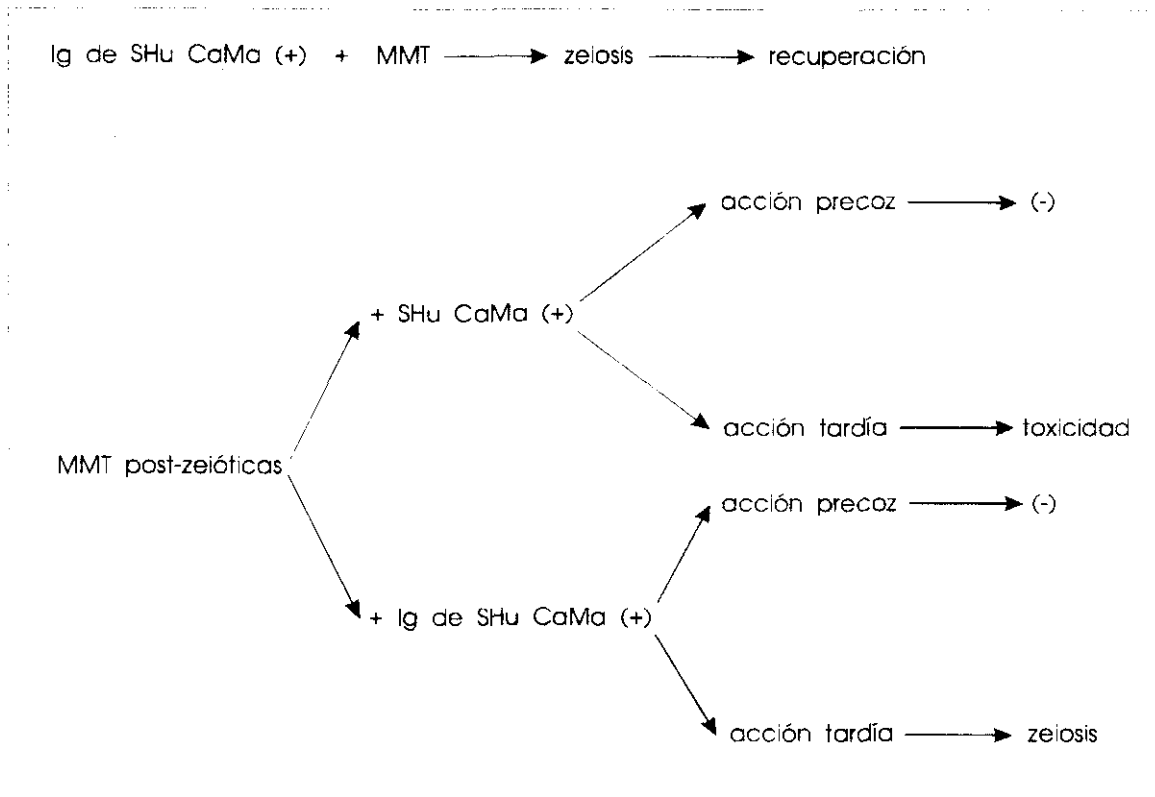


Figura 25

Efecto del SHu CaMa (+) y de las Ig de SHu CaMa (+) sobre las células MMT post-zeióticas

con mayor intensidad.

El 22 % (4/18) de los sueros sanguíneos de mujeres sanas no embarazadas mostraron efectos de diferenciación celular.

Los sueros de mujeres sanas y los SHu CaMa(+) y SHu CaMa(-) no produjeron modificaciones en las células de embrión de ratón utilizadas como control.

En suma, a partir de los datos de esta primera parte de nuestra investigación se podían distinguir las propiedades resumidas en la figura 26,

A) Sueros sanguíneos de enfermas con carcinoma mamario:

a) SHu CaMa(+), el efecto de diferenciación celular no es valorable con suero sin inactivar, dado que mata a las células en un tiempo menor del necesario para que se manifieste una posible diferenciación.

El posible efecto diferenciador se valoró realizando el ensayo con los sueros inactivados que produjeron diferenciación en el 27,3 % (3/11).

b) SHu CaMa(-), con efecto de diferenciación celular en el 75 % (6/8) cuando se utiliza medio con los sueros sin inactivar, disminuyendo moderadamente a 62,5 % (5/8) usando los sueros inactivados.

B) Sueros sanguíneos controles:

a) SHu de mujeres sanas no embarazadas con efecto de diferenciación en el 22 % de los casos (4/18)

b) SH mujeres, sanas embarazadas 100 % con efecto de diferenciación intenso en el 100 % de los casos (7/7),

A: SUECOS SANGÜÍNEOS DE ENFERMAS CON CARCINOMA MAMARIO:	
a) SBU CaMa (-)	El 57,9% (11/19) de los SBU CaMa es (-). Efecto de diferenciación celular no valorable con suero sin inactivar, caso que mata a las células en un tiempo menor del necesario para que se manifieste una posible diferenciación. Cuando se utiliza suero inactivado muestran efecto diferenciador el 27,3% (3/11);
b) SBU CaMa (+)	El 42,1% (8/19) de los SBU CaMa es (+). Muestra efecto de diferenciación celular en el 75% (6/8) cuando se utiliza medio sin inactivar, disminuyendo moderadamente a 62,5% (5/8) usando suero inactivado
B: SUECOS SANGÜÍNEOS CONTROLES:	
a) SBU de mujeres sanas no embarazadas	Con efecto de diferenciación en el 22% de los casos (4/18)
b) SBU de mujeres sanas embarazadas	Con efecto de diferenciación intenso en el 100% de los casos (7/7) con suero activo, disminuyendo discretamente a 85,7% (6/7) al inactivar el suero

Figura 26

Manifestaciones de diferenciación glandular mamaria de los distintos tipos
de sueros sanguíneos utilizados

disminuyendo discretamente a 85,7 % (6/7) al inactivar los sueros.

Los resultados mencionados se recogen en la figura 26.

Al observar la existencia de un efecto de diferenciación glandular de los sueros sanguíneos humanos de pacientes con carcinoma mamario sobre células indiferenciadas de adenocarcinoma mamario murino MMT establecidas "in vitro", procuramos estudiar algunas de sus características.

IV.C.2. CARACTERIZACION DE LOS FACTORES RESPONSABLES DEL EFECTO DIFERENCIADOR

Con objeto de caracterizar a los productos responsables del efecto diferenciador, se procedió a determinar su peso molecular aproximado empleando membranas de filtración de distinto diámetro de poro, comparando el efecto de los productos de SHu CaMa(+) y SHu CaMa(-).

Mediante membranas "Amicon Centriflo" que retienen a las moléculas cuyo peso molecular es mayor de 25.000 Da y dejan pasar las que tienen menos de 25.000 Da, y otras que detienen a las mayores de 50.000 Da y dejan pasar a las de un peso molecular inferior, se consiguieron varias fracciones séricas que se concentraron por el sistema de los microconcentradores Minicon A50 y A25 de Amicon, las cuales se añadieron al medio de crecimiento de los cultivos de células MMT.

Se observó que el o los factores que provocaban la

diferenciación glandular se encontraban en la fracción con moléculas mayores de 50.000 Da. Los análisis demostraron que se trataba de proteínas (figura 27).

IV.C.3. DESARROLLO DEL FENOMENO

El proceso se desarrolló de la forma descrita a continuación.

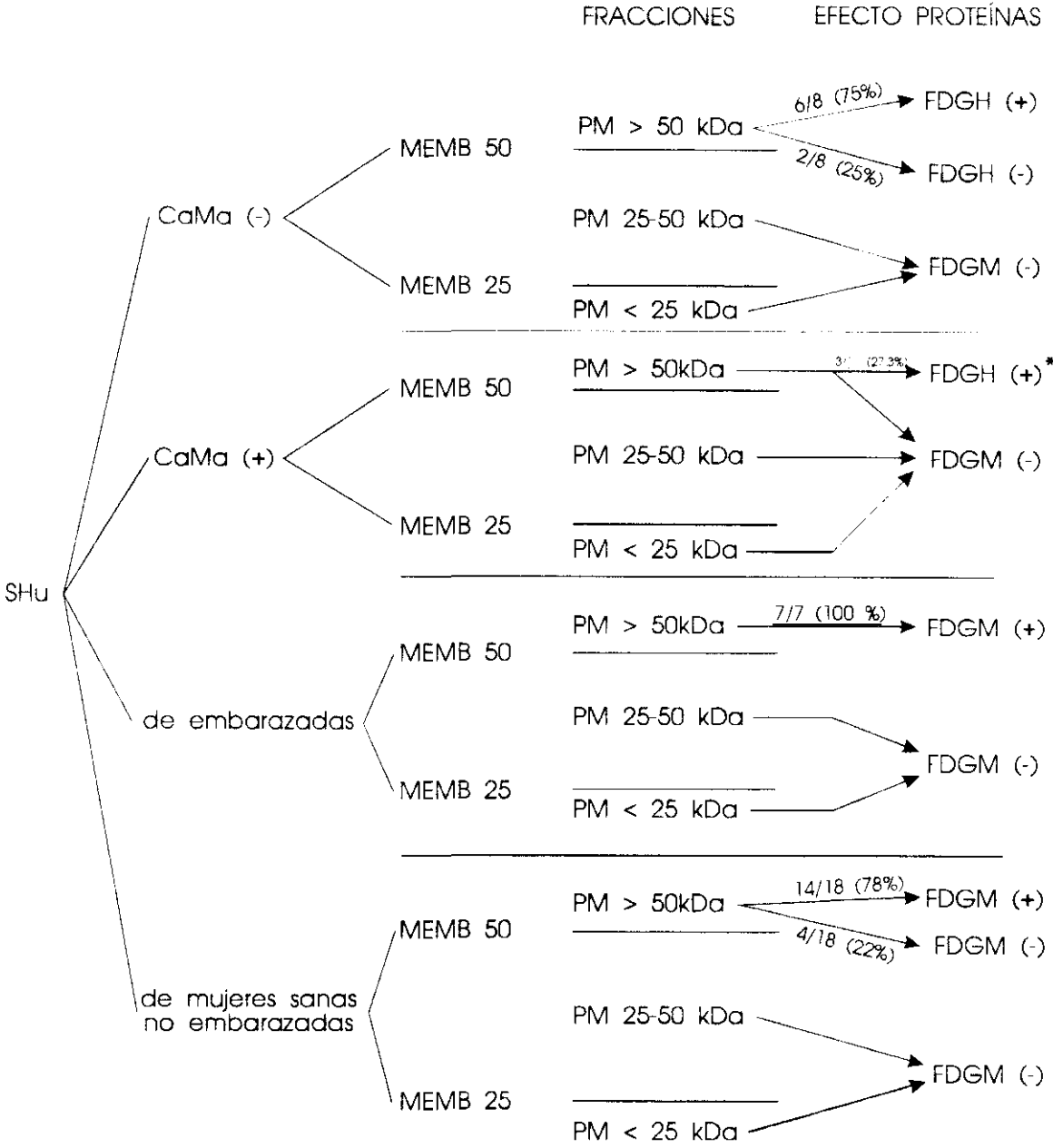
En la figura 23 se puede ver la curva de crecimiento de las células MMT nativas en medio de crecimiento suplementado con 10 % de suero de ternera. Las células que se depositan en el frasco comienzan a fijarse a su superficie a las pocas horas y comienzan a dividirse. A las 24 horas aparecen todas adheridas y dispersas.

La tasa de reproducción celular es elevada, aumentando a partir de las 48 horas de cultivo. Al cuarto día, la población preconfluyente puede verse en la figura 28. Conservan un crecimiento logarítmico aproximadamente hasta el quinto día de cultivo, en que la monocapa se encuentra en fase confluyente.

Posteriormente las células se aprietan y disminuyen su tasa de reproducción. Si se dejan evolucionar, las células tienden a desprenderse a partir del séptimo día de cultivo.

En condiciones de mantenimiento óptimo conviene hacer el subcultivo de las células al cuarto día, cuando se encuentran en pleno crecimiento exponencial.

Cuando las células MMT se suplementan con los sueros



* Este resultado se obtiene cuando los ensayos se hacen en ausencia de actividad de complemento por inactivación a 56° C, 30 min.

SHu=suero sanguíneo humano

Figura 27

FRACCIONES DE DISTINTOS PESOS MOLECULARES Y PRESENCIA DEL FACTOR DE DIFERENCIACIÓN GLANDULAR MAMARIA (FDGM)

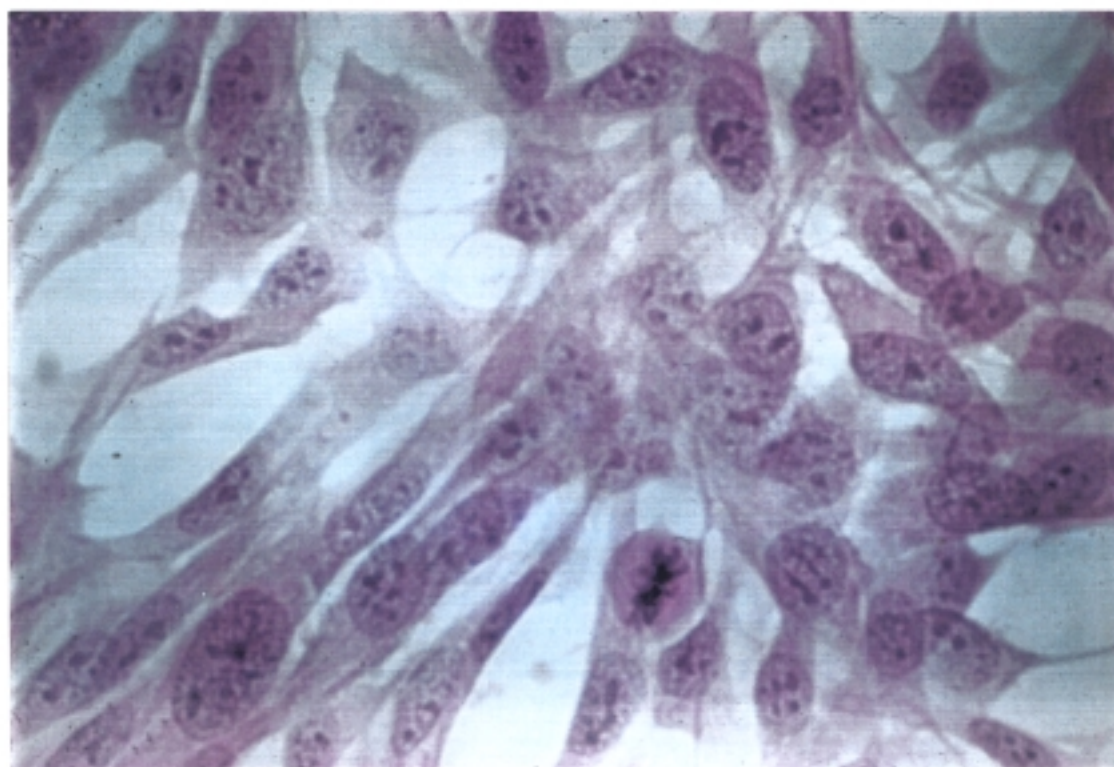


Figura 28

Células MMT. Control morfológico a los 4 días de la siembra, teñidas con hematoxilina-eosina. Aumento 900x.

sanguíneos humanos que tienen efecto diferenciador, según se mencionó, se observa la producción en puntos dispersos de agrupamientos celulares que crecen volumétricamente en distinto grado, por superposición de células en varias capas. Entre los grupos se aprecian células aplanadas en forma de monocapa adheridas a la superficie del frasco de cultivo, como en los cultivos control.

En las figuras 29, 30 y 31 se ve el aspecto a los 5 días, equivalente a la fase preconfluente de los cultivos control, de las células que han proliferado de forma organizada en las condiciones que se explican al pie de las figuras. Los agrupamientos celulares mayores adoptan la forma de casquetes esféricos, los cuales aumentan en número y volumen a los 6 días del cultivo. A partir de sexto día, algunos agrupamientos comienzan a desprenderse por razones mecánicas.

IV.C.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE PROLIFERACION Y DIFERENCIACION

La realización de cultivos a distintas temperaturas mostró los siguientes hechos:

a) Cuando el cultivo de células MMT con sueros que presentan efecto diferenciador se realiza a 32° C, el crecimiento de la población es más lento pero aumenta alrededor de 10 veces el número de agregados pseudoglandulares que se producen, en relación al cultivo a 37° C (figuras 29, 30 y 31).

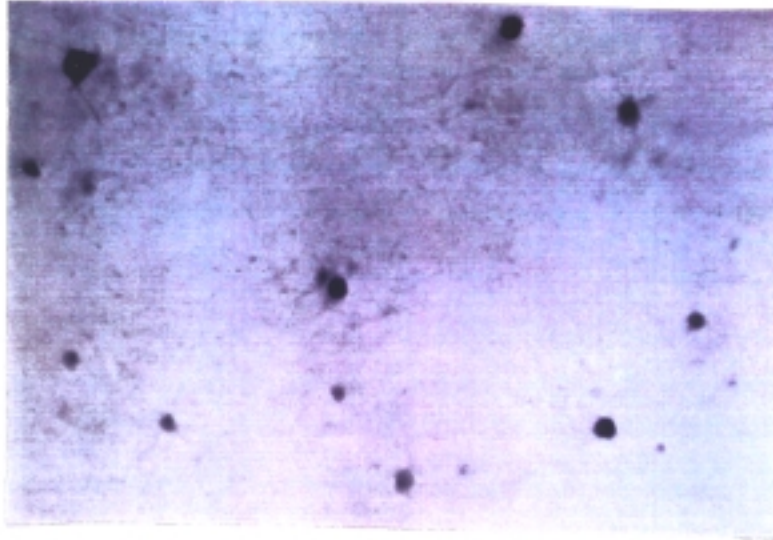


Figura 29

*Agregados pseudoglandulares de células MMT cultivadas a 37° C.
Aumento 10x*

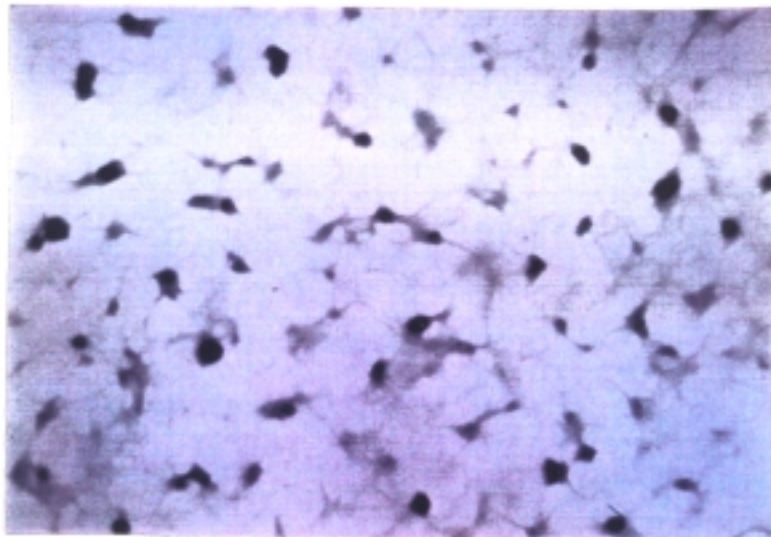


Figura 30

*Agregados pseudoglandulares de células MMT de cultivo
suplementado con el mismo suero que en la figura 29 mantenido
a 32° C. A las 120 horas. Aumento 10x.*

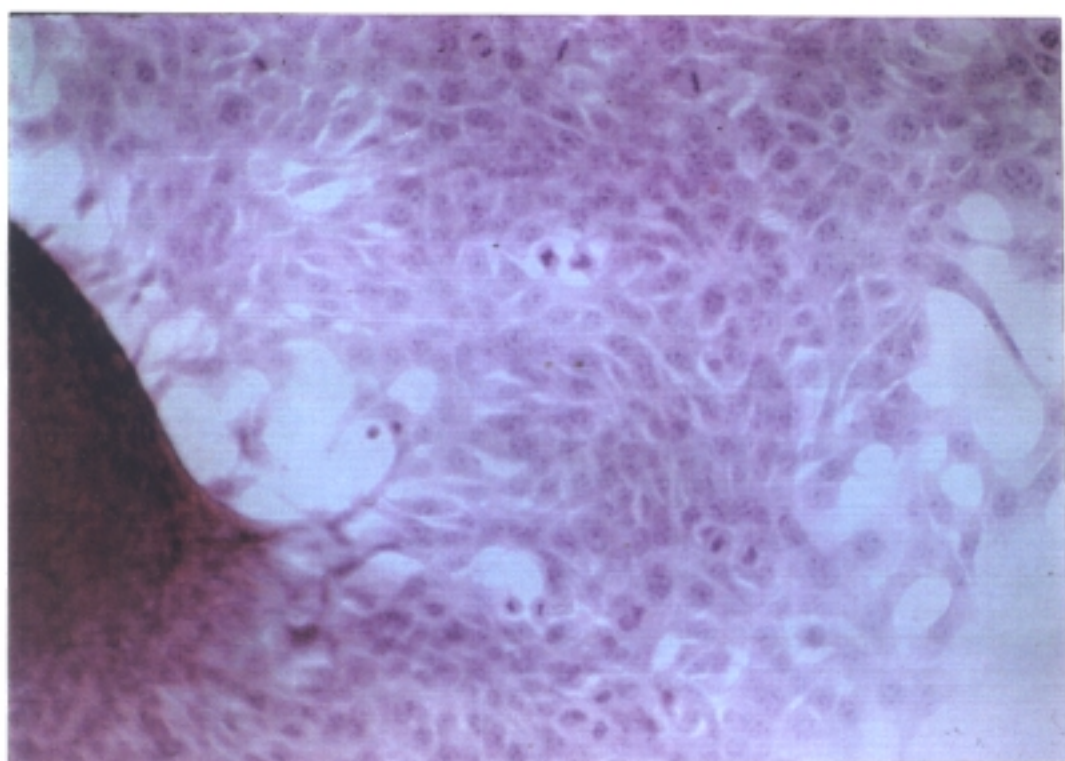


Figura 31

Aproximación al borde de un agregado pseudoglandular a mayor aumento. Tinción hematoxilina-eosina. Aumento 200x.

b) Si el cultivo de los agregados pseudoglandulares formados a 32° C se continúa a 37° C, todos los agregados persisten, creciendo a mayor velocidad.

c) Si el medio de crecimiento basal es suplementado con suero inductor de agregados pseudoglandulares previamente incubado a 56° C durante 30 minutos, para inactivar a las moléculas termosensibles, el crecimiento celular y el efecto diferenciador se producen prácticamente de la misma manera que cuando se emplea el suero nativo.

Se analizaron 15 sueros antes y después de la inactivación. Antes de la inactivación manifestaron efecto diferenciador 13 de los 15 (86,6 %), conservando el efecto después de la inactivación 11 de 15 (73,3 %).

Se trata por lo tanto de factores termoestables (figura 32).

IV.C.5. NECESIDAD DE LA PRESENCIA DEL FACTOR DE DIFERENCIACION PARA LA MANIFESTACION Y CONSERVACION DEL FENOMENO

Los agrupamientos celulares se recogieron centrifugando a 100 x G durante 5 minutos y su estudio histológico mostró una estructura de células bien adosadas entre sí de manera ordenada, con aspecto pseudoglandular (figuras 33 y 34). Como se dijo, las tinciones histoquímicas con Sudán III revelaron que las células contenían gran cantidad de material graso (figura 35).

Cuando los grupos pseudoglandulares recogidos por

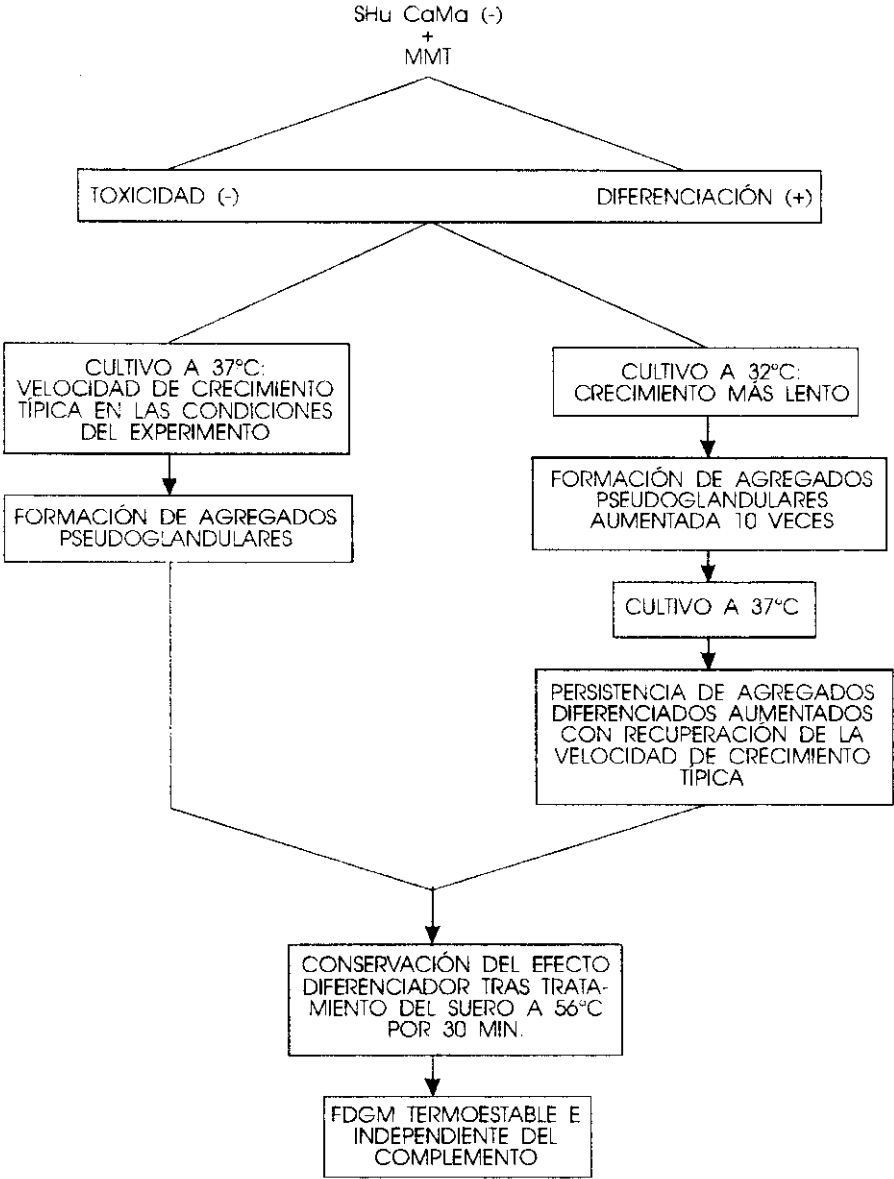


Figura 32

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE DIFERENCIACIÓN PSEUDOGLANDULAR MAMARIA

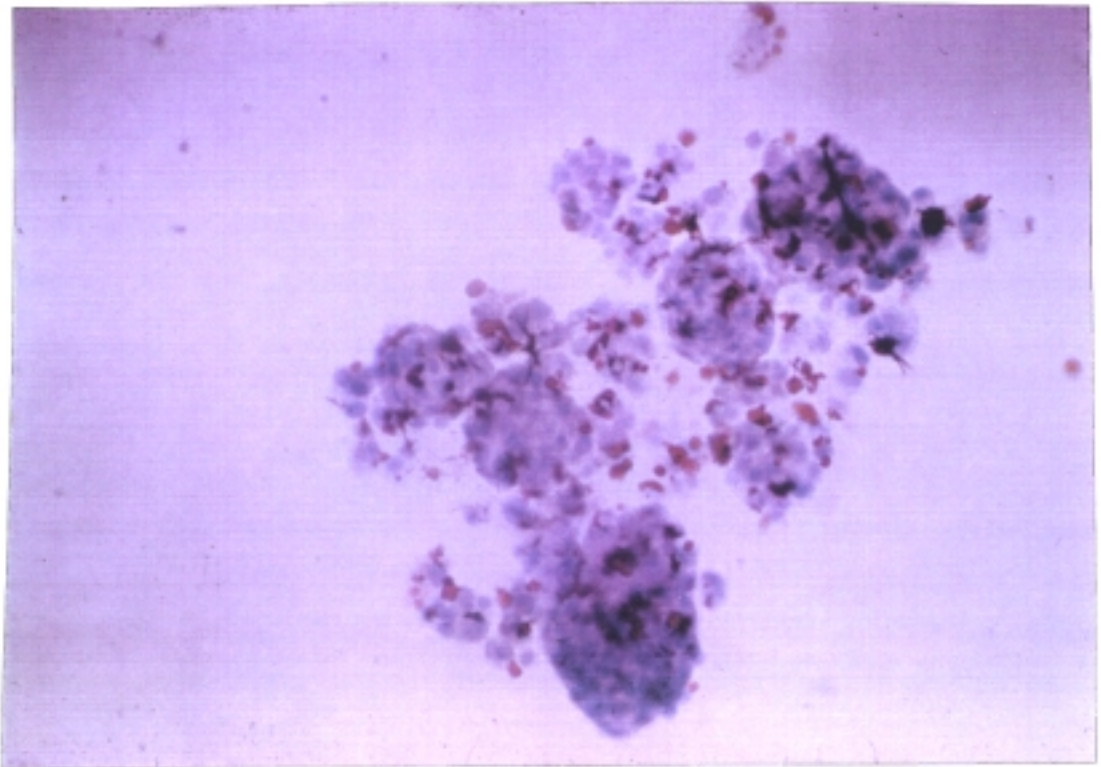


Figura 35

*Determinación histoquímica de grasa en los agregados
seudoglandulares de células MMT aislados teñidos con Sudán
III. Aumento 125x.*

centrifugación son desperdigados con tripsina y se cultiva en medio de crecimiento basal, suplementado con 10 % de suero de ternera, crecen en forma similar a las células MMT control, formando una capa confluyente a los 6 días de cultivo.

O sea, que la diferenciación celular manifestada por la formación de agrupados pseudoglandulares desaparece en ausencia de los factores de diferenciación de los sueros humanos.

Si el medio de crecimiento basal se suplementa con suero con efecto diferenciador o con la fracción que contiene las moléculas con peso molecular superior a 50.000 Da, se vuelven a producir las formaciones pseudoglandulares.

En las mismas condiciones experimentales, en los frascos sembrados con células dispersas procedentes de agregados pseudoglandulares aumentan también significativamente (unas 8 veces) el número de agregados inducidos por un mismo suero respecto al inducido en las células MMT originales.

En suma, que el efecto diferenciador es inducido por los factores de diferenciación glandular mamaria (FDGM) (figura 36).

Tiene carácter termoestable, independiente del complemento, y necesita estar presente para que la diferenciación se manifieste y conserve. El fenómeno de la diferenciación celular desaparece en ausencia de los factores de diferenciación y la capacidad de respuesta (expresión de posibles receptores del FDGM) es mayor en las células MMT de las formaciones pseudoglandulares.

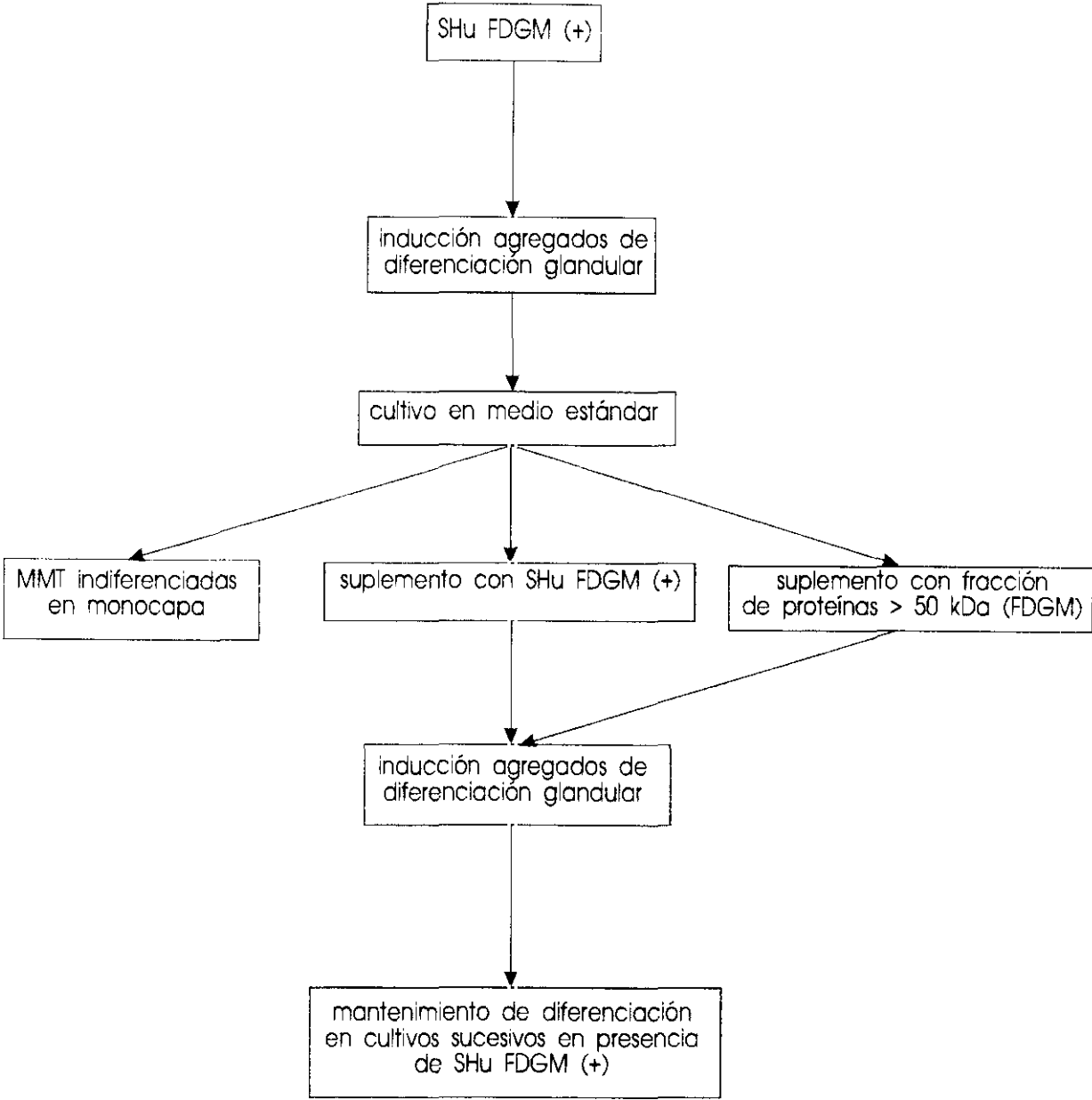


Figura 36

NECESIDAD DE LA PRESENCIA DE FDGM PARA LA MANIFESTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

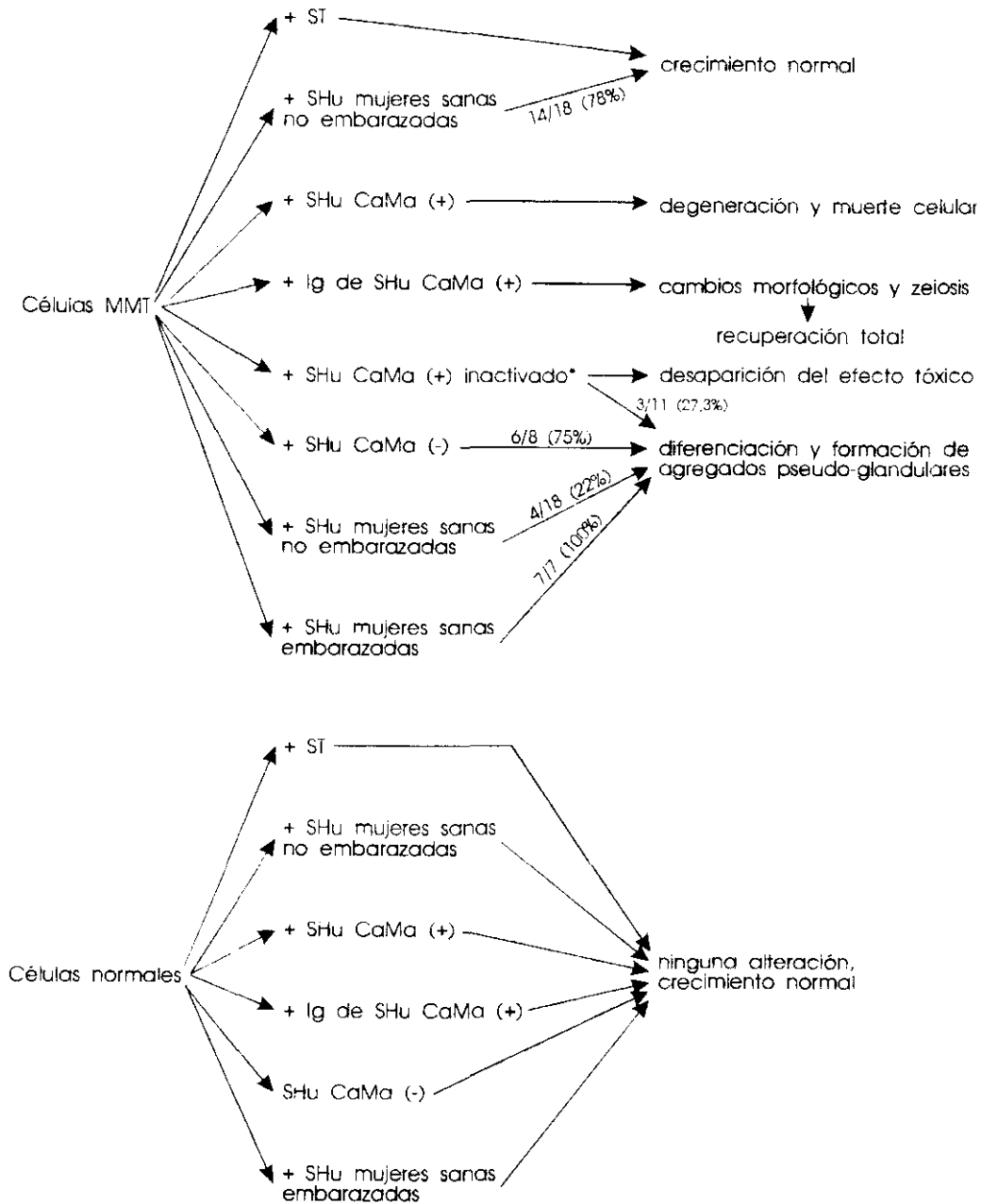
En la figura 36 bis se recogen en conjunto los efectos de los distintos suplementos utilizados sobre las células cancerosas MMT y sobre las células normales de embrión de ratón utilizadas como control.

IV.CH. REACCIONES HUMORALES Y CELULARES CRUZADAS ENTRE LOS CARCINOMAS MAMARIOS HUMANO Y MURINO

En esta parte del trabajo estudiamos las reacciones inmunológicas del suero sanguíneo de enfermas con carcinoma mamario frente a células MMT, línea establecida a partir de un carcinoma mamario murino. El efecto producido lo comparamos con el observado frente a células normales. El control como células normales se realiza con células embrionarias de embrión de ratón.

Observamos que las células cancerosas humanas y las células MMT murinas muestran reacciones cruzadas entre los antígenos viroinformados y los viro-inducidos de las células cancerosas murinas, y los antígenos homólogos que son expresión de genes celulares de las células cancerosas humanas.

El desarrollo de la siguiente serie de experimentos hacia necesario reconocer el carácter canceroso de las células utilizadas en las inoculaciones e inmunizaciones, y analizar de los efectos de los linfocitos de los animales inoculados.



ST=suero de ternera; SHu=suero humano; Ig=inmunoglobulinas; SHu CaMa (+)=suero de pacientes con cáncer de mama tóxico para células MMT; SHu CaMa (-)=suero de pacientes con cáncer de mama no tóxico para células MMT

*El posible efecto de diferenciación glandular mamaria del SHu CaMa (+) no sería valorable utilizando suero sin inactivar el complemento, porque entonces las células morirían por el efecto tóxico sin dar lugar a manifestaciones que, como la diferenciación en este caso, requieren más tiempo

Figura 36 bis

EFFECTO DE DISTINTOS SUPLEMENTOS SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS MMT Y CÉLULAS NORMALES DE EMBRIÓN DE RATÓN

IV.CH.1. PRUEBAS DE TUMORIGENICIDAD

Para el reconocimiento del carácter canceroso se hicieron pruebas de tumorigenicidad de las células de la línea MMT.

Cuando se inocularon 100.000 células MMT a ratones Swiss recién nacidos, se desarrollaron tumores en todos los animales, que evolucionaron hasta la muerte en pocas semanas (figura 37).

Cuando el mismo número de células MMT se inoculó a ratones adultos jóvenes, de tres o cuatro meses de edad, el 15 % no desarrolló tumores y el 85 % los desarrolló inicialmente, pero posteriormente involucionaron y fueron rechazados gracias a una respuesta inmunológica.

IV.CH.2. INTER-RELACIONES ENTRE SUEROS SANGUINEOS Y LINFOCITOS HUMANOS Y MURINOS

Para el estudio del efecto de los linfocitos humanos y de ratón buscamos primeramente las mejores condiciones de su aislamiento.

IV.CH.2.a. Cultivo de células linfoides. Obtención linfocitos circulantes humanos y de ratón

Las células linfoides cultivadas en medios definidos suplementados con sueros autólogos, homólogos o heterólogos y en ausencia de mitógenos y factores de crecimiento, poseen una

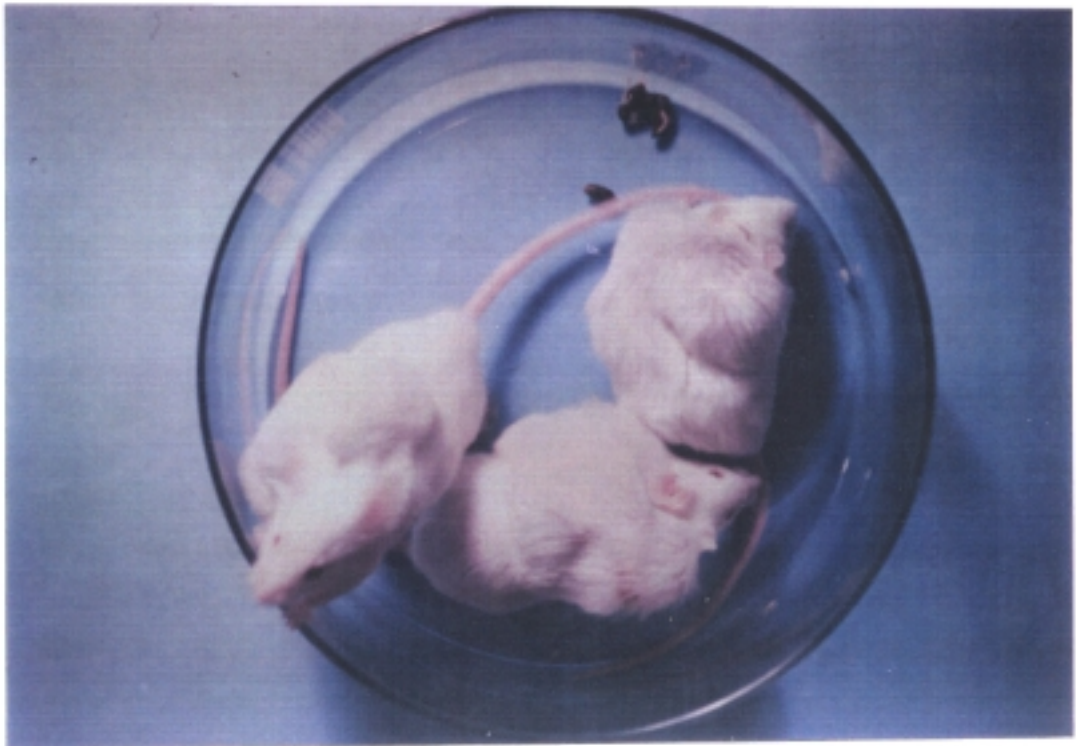


Figura 37

*Ratones con tumores producidos por la inoculación de células
MMT.*

capacidad proliferativa muy baja, con un crecimiento mínimo y una gran tendencia a disminuir el número de células en pocos días. En la figura 38 puede verse la evolución de linfocitos esplénicos de ratón y linfocitos humanos de sangre periférica cultivados en medio de crecimiento definido suplementado con 10 % de suero bovino fetal.

Esta capacidad proliferativa puede estimularse suplementando los medios con mitógenos o factores de crecimiento específicos. Así, en la figura 39 puede observarse la evolución de linfocitos aislados de sangre periférica humana cultivados con y sin fitohemaglutinina (PHA).

En la figura 40, puede verse el aspecto morfológico que presentan las células linfoides mantenidas en medio de cultivo. Debido a la escasa tendencia que tienen a adherirse a la pared del frasco de cultivo, quedan en suspensión.

Las células libres pueden presentar una morfología variada, observándose unas células esféricas y otras con forma de renacuajo. En la figura 41 puede verse a mayor aumento el aspecto que presentan fijados y teñidos con Giemsa.

Tras la adición de PHA, hay tendencia a formar agregados que van aumentando de tamaño por la proliferación de dichos agregados y la fusión de otros grupos aislados, pudiendo llegar a ser muy voluminosos.

La PHA estimula la producción de interleucina-2 (IL-2), llamada anteriormente factor de crecimiento de los linfocitos T, descrito por Morgan, Ruscetti y Gallo en 1976. La nueva

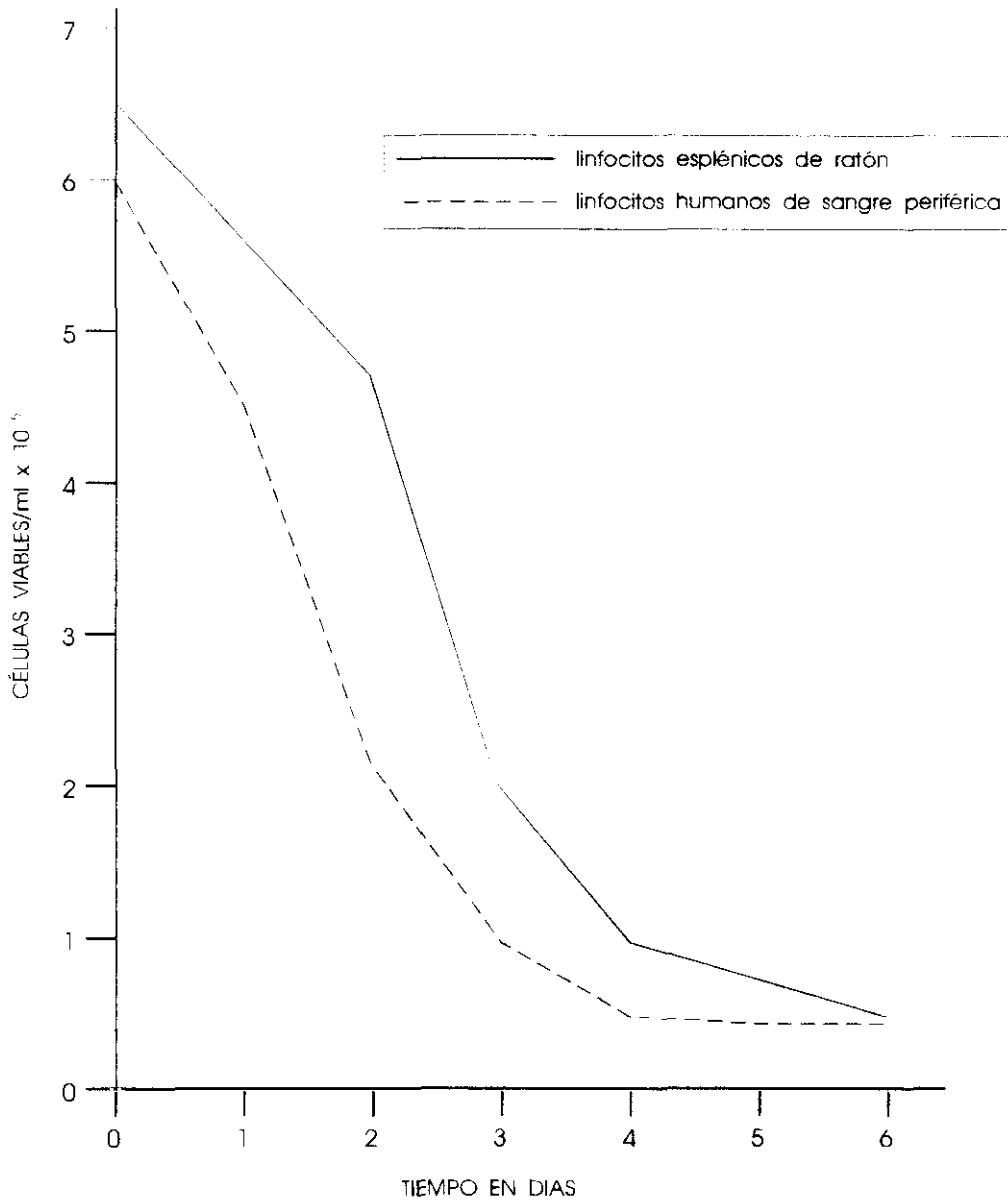


Figura 38

VIABILIDAD DE LOS LINFOCITOS HUMANOS Y MURINOS EN MEDIO SIN MITÓGENOS

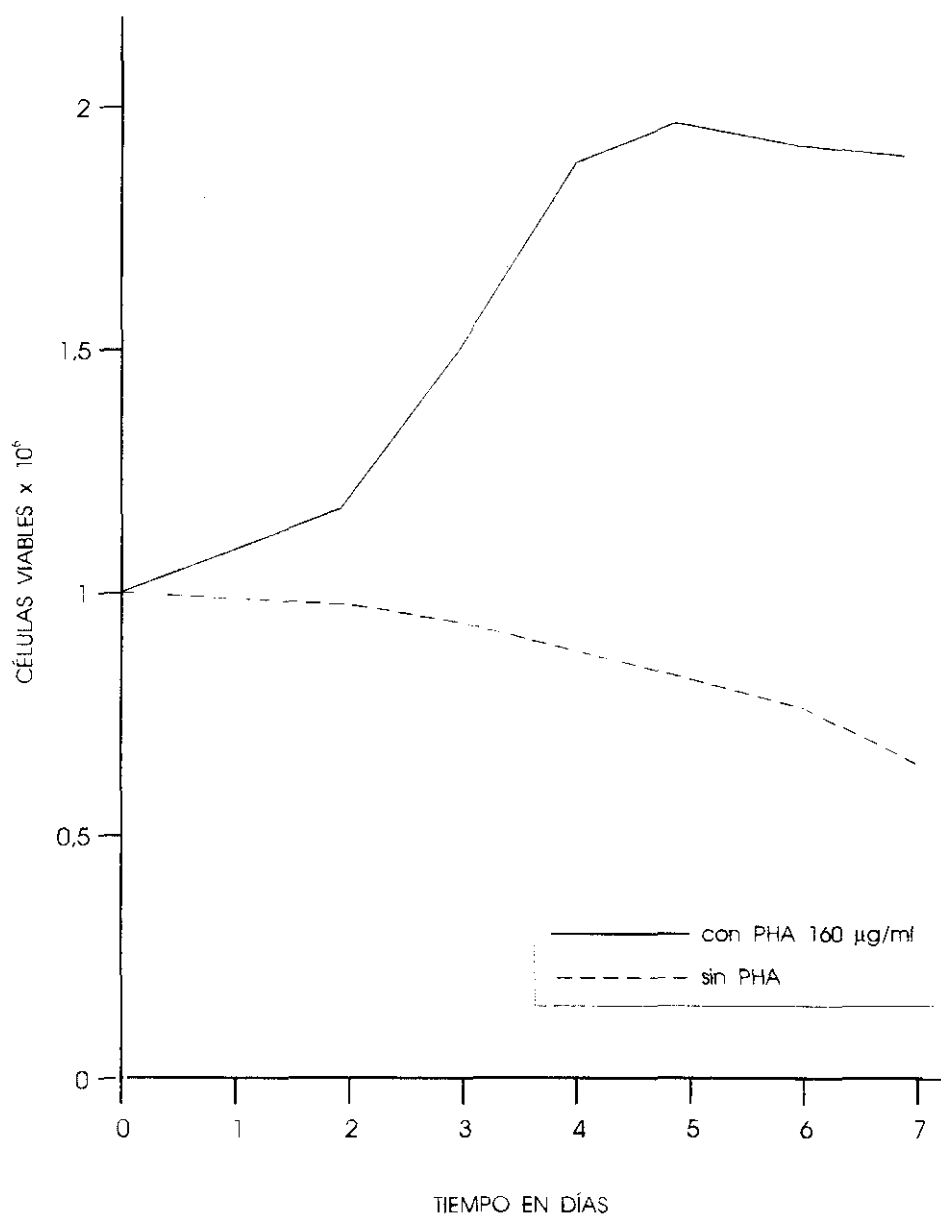


Figura 39

ESTÍMULO PROLIFERATIVO DE LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE
PERIFÉRICA CON UN MITÓGENO INESPECÍFICO

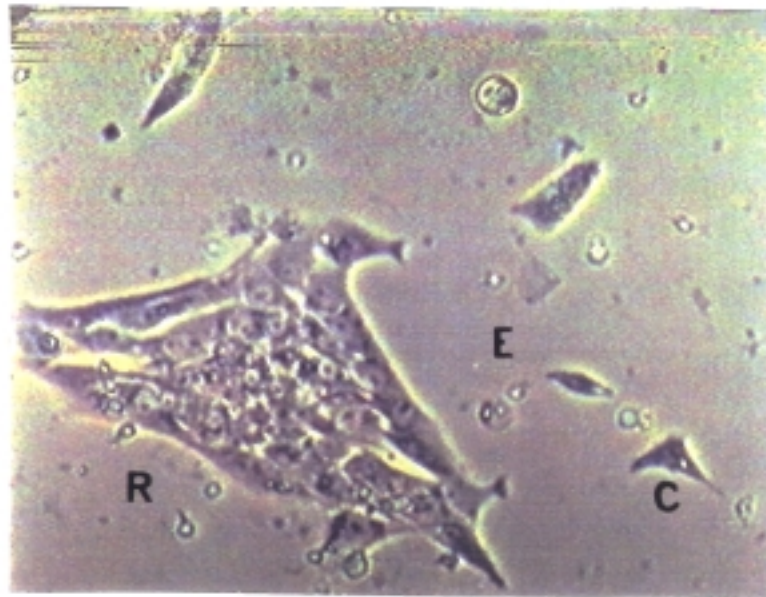


Figura 40

*Linfocitos humanos libres con distinta morfología vistos por
contraste de fases. Los elementos grandes corresponden a
células MMT.*

*R = linfocitos con morfología en "renacuajo"
E = linfocitos con morfología esférica
C = célula MMT*

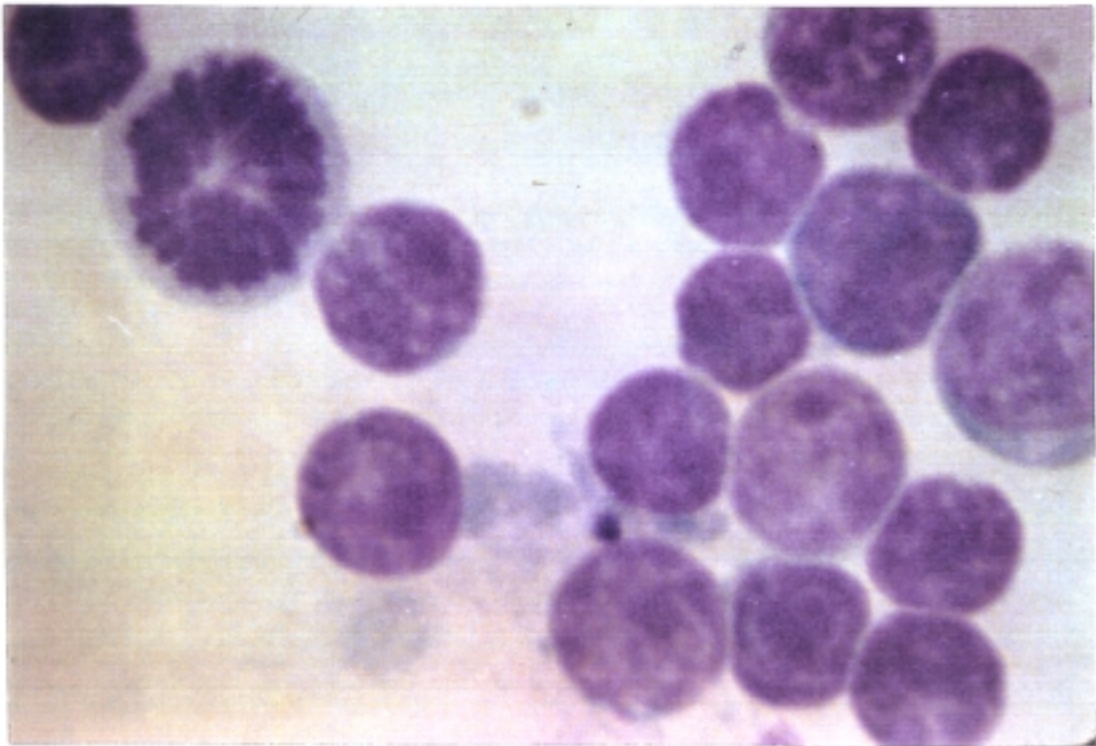


Figura 41

*Linfocitos humanos vistos por tinción con Giemsa. Aumento
1420x.*

denominación se debe a Aarden en 1979. Para poder mantener los cultivos de células linfoides por períodos de tiempo prolongados y poder establecer líneas celulares linfoides adaptadas a crecer indefinidamente en cultivos, se han utilizado diversos factores purificados, como la IL-2, que favorecen la proliferación de dichas células y permiten el cultivo continuado (Fathman y Fitch, 1984).

IV.CH.2.b. Observacion de los efectos de los linfocitos humanos y murinos sobre las células MMT

Estudiando la reactividad humoral y celular (linfocitaria) de estos animales se hicieron las siguientes observaciones:

a) El suero sanguíneo del 100 % (10/10) de los ratones adultos jóvenes control, que no han sido inoculados con células MMT, no produce efectos tóxicos sobre las células MMT.

b) Los linfocitos de los ratones adultos jóvenes control, que no han recibido las células MMT, no tienen efectos citotóxicos sobre las células MMT, en el 100 % (10/10) de los casos.

c) El suero sanguíneo del 100 % (7/7) de los ratones adultos jóvenes que han sido inoculados con células MMT y han desarrollado un tumor que ha regresado de manera espontánea, carece de efectos tóxicos sobre las células MMT.

ch) Curiosamente, aunque carente de serotoxicidad, el 100 % (7/7) de dichos sueros murinos induce modificaciones

morfodinamicas semejantes a las que producen las inmunoglobulinas de los SHu CaMa(+) e inhiben la serotoxicidad de los sueros sanguíneos humanos que poseen la característica de ser serotóxicos, SHu CaMa(+).

d) Los linfocitos de los ratones adultos jóvenes que han desarrollado un tumor que ha regresado espontáneamente tienen en el 100 % (6/6) de los casos una acción citotóxica marcada sobre las células MMT.

e) Los ensayos por el método de Takasugi y Klein en microplacas muestran que se trata de una linfotoxicidad anti-MMT mediada por anticuerpos complemento-dependientes, puesto que desaparece al inactivar el suero por calentamiento, 30 minutos a 56° C. Al efecto, se siembran pocillos con un mismo número de células y se incuban con suspensiones de linfocitos en concentración creciente. Se añade a una serie suero autólogo nativo y a otra serie paralela suero autólogo en el que el complemento se ha inactivado por calor (figura 42).

f) Los linfocitos aislados de mujeres con carcinoma de mama no poseen acción linfotóxica sobre las células MMT.

g) Una pequeña proporción de los linfocitos aislados de las mujeres con carcinoma de mama (alrededor del 2 %), presenta un marcado linfotropismo sobre las células MMT.

h) El linfotropismo de los linfocitos humanos por las MMT es inhibido cuando el medio de cultivo se suplementa con suero sanguíneo de ratones que han rechazado al tumor.

i) El linfotropismo no se observa en los linfocitos

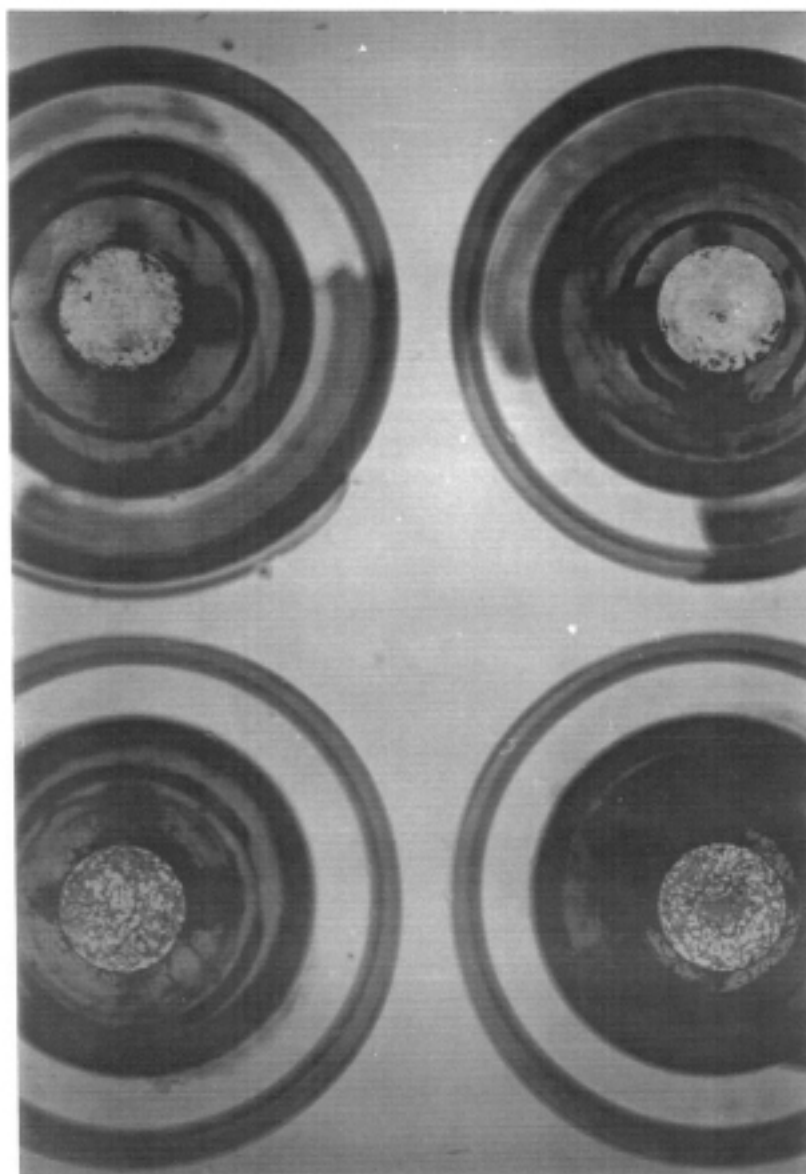


Figura 42

Prueba de linfotoxicidad por el método de Takasugi y Klein en microplaca de Terasaki. Aumento 12x.

aislados de mujeres sanas (6/6). El estudio de los fenómenos de linfotropismo se realizó utilizando la técnica de cinefotomicrografía de intervalos.

Los cultivos mixtos de linfocitos procedentes de controles sanos con células cancerosas evolucionan como se puede ver en el esquema de la figura 43. El linfotropismo descrito para las mujeres con carcinoma de mama es morfodinamicamente similar al de los linfocitos inmunizados "in vitro" contra células cancerosas. En la sangre periférica de las pacientes preexiste este tipo de tropismo contra las células MMT hasta en un 3% de los linfocitos.

En los controles sanos (figura 43-I) no se observa ningún linfocito con este tipo de tropismo.

Todas estas observaciones aparecen en el esquema de la figura 44.

IV.D. CARACTERIZACION DE LOS ANTIGENOS RESPONSABLES DE LAS REACCIONES CRUZADAS ENTRE LAS CELULAS DE LOS CANCERES DE LA GLANDULA MAMARIA HUMANOS Y MURINOS

Se ha demostrado que las células de carcinoma mamario humano contienen proteínas homólogas a las del MMTV.

Como en algunos experimentos comprobamos este hecho, hicimos un estudio sobre la presencia de virus vegetativos y ADNc de provirus incorporados en las células MMT y las posibles reacciones cruzadas entre antígenos víricos y antígenos de ADNc

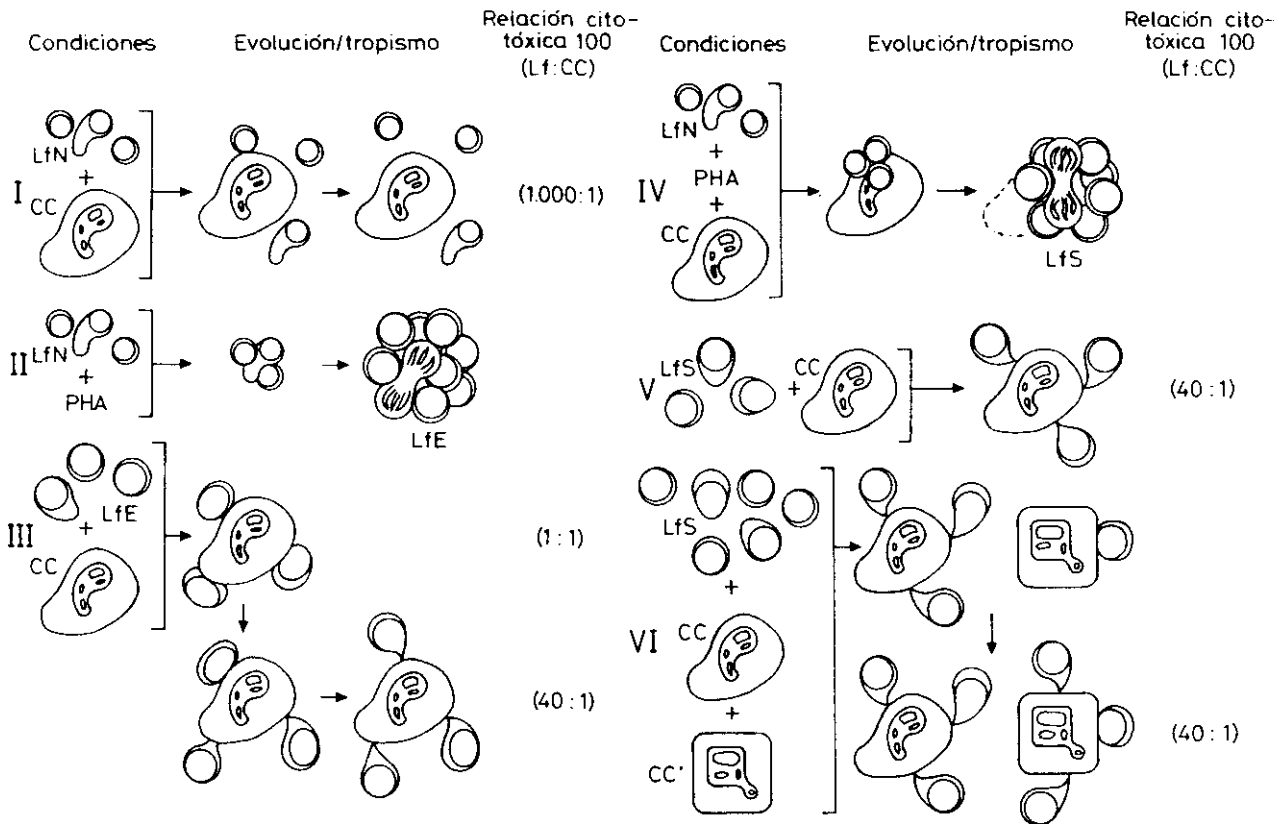


Figura 43

Esquema de los fenómenos de tropismo y linfoxicidad en distintas condiciones experimentales.

LfN = linfocitos nativos

CC = células cancerosas MMT (adenocarcinoma mamario murino)

PHA = fitohemaglutinina

LfE = linfocitos estimulados (linfocitos nativos estimulados con PHA)

LfS = linfocitos sensibilizados (linfocitos estimulados en presencia de monocitos, PHA y células cancerosas). Inmunización "in vitro"

CC = células cancerosas HeLa (carcinoma de cuello uterino humano)*

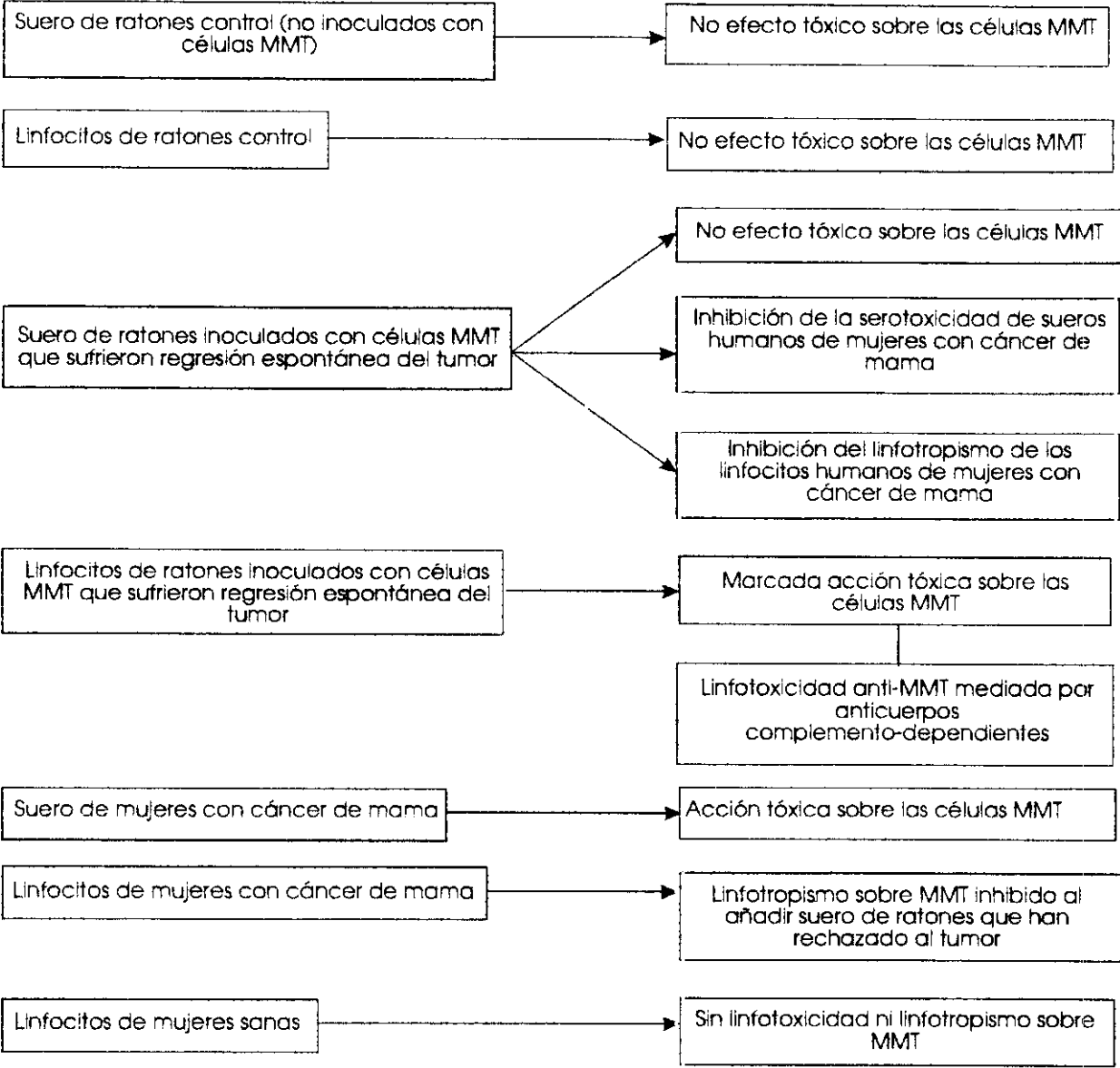


Figura 44

REACTIVIDAD HUMORAL Y CELULAR. INTERRELACIONES ENTRE SUEROS SANGUÍNEOS Y LINFOCITOS HUMANOS Y MURINOS

províricos de las células MMT con los factores inmunológicos humanos.

IV.D.1. EL PROBLEMA DE LOS VIRUS ONCOGENICOS

Las observaciones recogidas hasta aquí mostraron que existían reacciones inmunológicas humorales y celulares cruzadas entre el carcinoma ductal infiltrante de la glándula mamaria humana y las células de la línea establecida MMT, procedente de un adenocarcinoma de ratón.

En efecto: a) mediante inmunofluorescencia, los sueros sanguíneos de 68,4 % de las mujeres que padecían cáncer de mama contenía anticuerpos que reaccionaban con antígenos de las células MMT; b) la absorción de los sueros sanguíneos con células MMT elimina la inmunofluorescencia, por reacción cruzada entre anticuerpos humanos y antígenos murinos; c) en la sangre periférica de mujeres con cáncer de mama existen linfocitos que presentan un marcado tropismo sobre células MMT; ch) los sueros de los ratones inmunizados con células MMT inhiben el tropismo de los linfocitos humanos, lo cual revela posiblemente el bloqueo de los efectores de los linfocitos humanos con los anticuerpos presentes en el suero murino.

Es bien sabido que la principal etiología del cáncer mamario murino está relacionada con virus oncogénicos con genoma de ARN (oncornavirus) que, además, tienen las propiedades de los retrovirus, es decir, de aquellos virus ARN

que mediante el proceso de la transcripción inversa producen un ácido desoxirribonucleico complementario o ADNc que se incorpora al genoma de las células infectadas.

En las fotografías al microscopio electrónico de las figuras 45 y 46 se pueden ver las características morfológicas de las partículas víricas del MMTV.

En los cultivos primarios de células de adenocarcinoma mamario murino CH3 se evidencian al microscopio electrónico partículas víricas que se observan en mayor cantidad y en mayor número de células cuando los cultivos se tratan con dexametasona a razón de 35 μ g/ml durante 48 horas (figuras 47 y 48).

Estos hechos nos llevaron al estudio de la presencia de retrovirus vegetativos en las células cancerosas murinas de la línea MMT y al análisis de posibles provirus por incorporación del ADNc vírico.

IV.D.2. OBSERVACIONES EN LAS CELULAS MMT

En la figura 49 podemos ver el aspecto que presentan las células MMT fijadas e incluidas al sexto día de cultivo.

Tras el estudio detallado de esta sublínea celular MMT con el microscopio electrónico, no se pudieron detectar partículas víricas de tipo A o B del virus de los tumores mamarios del ratón o MMTV (por "mouse mammary tumor virus"), a pesar de ser ésta una de las características descritas por los

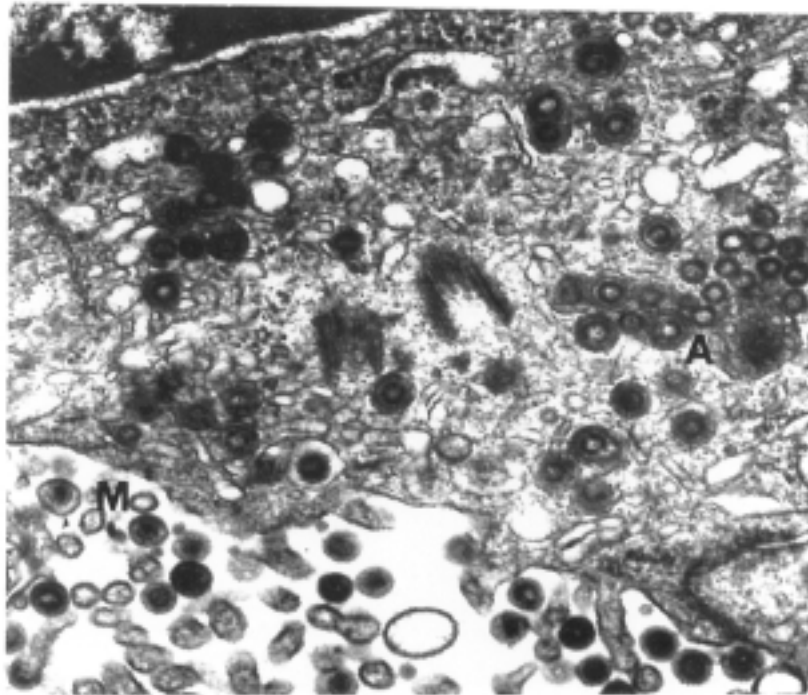


Figura 45
MMTV visto al microscopio electrónico. Aumento 50.000x

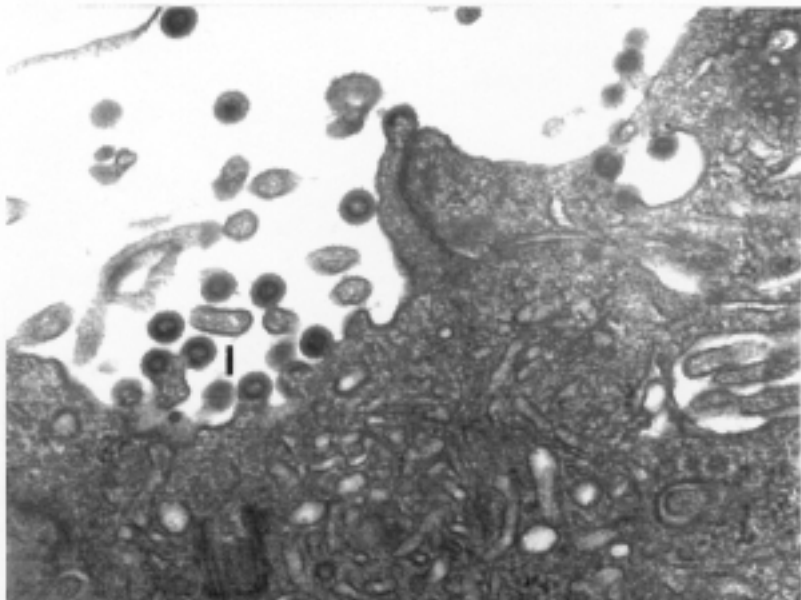


Figura 46
Otra fotografía de MMTV visto al microscopio electrónico. Aumento 50.000x.

A = partículas víricas de tipo A-intracitoplásmicas
M = partículas de mMTV maduras
I = partículas de MMTV inmaduras

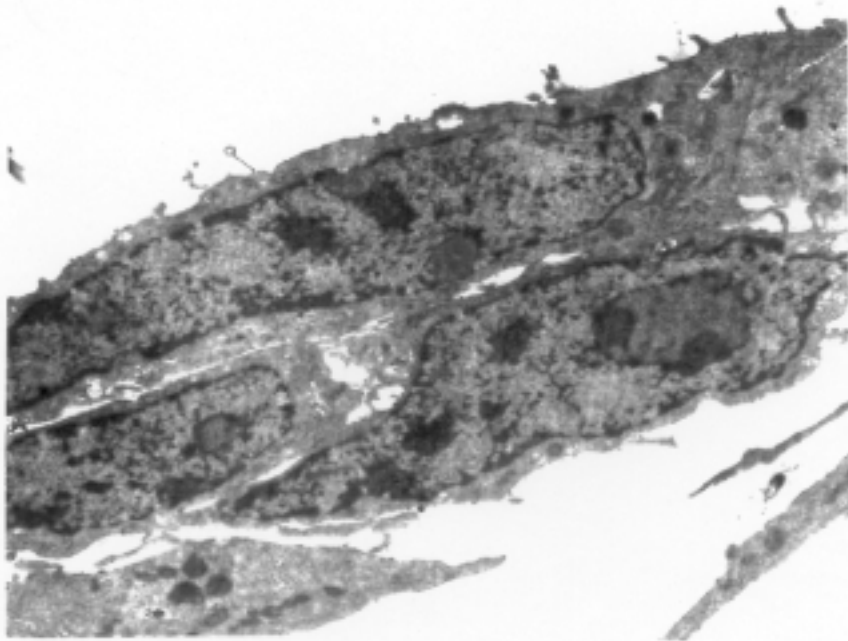


Figura 47
Células de adenocarcinoma mamario de ratón C3H/He sin ningún
tratamiento. Vistas con el microscopio electrónico. Aumento
12.500x.

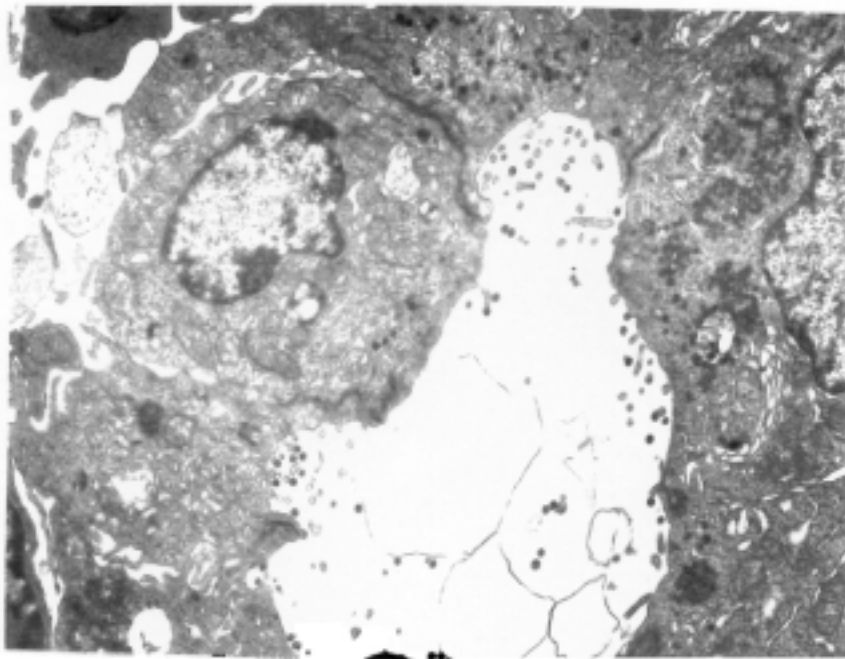


Figura 48
Células de adenocarcinoma mamario de ratón C3H/He a las 48
horas del tratamiento con dexametasona. Vistas con el
microscopio electrónico. Aumento 12.500x.



Figura 49

Células MMT al sexto día de cultivo, vistas al microscopio electrónico. No se observan partículas víricas. Aumento 6.500x.

autores cuando la línea celular fue originalmente establecida "in vitro".

Tampoco observamos partículas MMTV en las células MMT tratadas con Dexametasona.

La pérdida de la capacidad para liberar virus "in vitro" como la encontrada en nuestra línea de MMT, ha sido descrita por Cykes (1968) y Lasfargues (1970) en algunas sublíneas de células MMT; esta es la situación de nuestra sublínea celular después de más de 200 pases en nuestro departamento.

En los bordes de la membrana plasmática de estas células se observan numerosas zonas densas que, a bajos aumentos parecen corresponde a hemidesmosomas (figura 50).

También se observan zonas de organización de la membrana en capas superpuestas que en algunos casos adquieren la forma de figuras en huella digital (figura 51), fenómeno que se observa en algunas células infectadas con virus.

La ausencia de virus oncogénicos vegetativos en la sublínea celular MMT con la que trabajamos, nos hizo realizar dos tipos de experimentos, si queríamos conocer las posibles relaciones entre los antígenos de las células de carcinoma mamario en la mujer, por un lado, y los antígenos viroinformados, los antígenos viro-inducidos y al propio virus de los carcinomas mamaros del ratón o MMTV, por otro lado.

En primer lugar, averiguar si, a pesar de no existir partículas víricas, se expresaban antígenos de ADN provírico.

En segundo lugar, aislar MMTV de algunos tipos de células

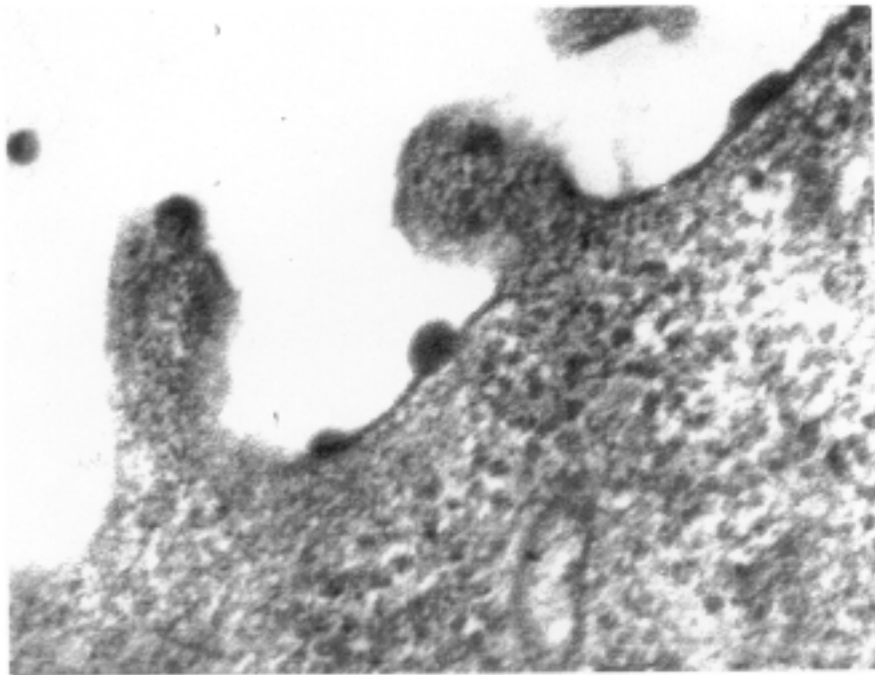


Figura 50

Células MMT. Figuras en huella digital. Aumento 165.000x.

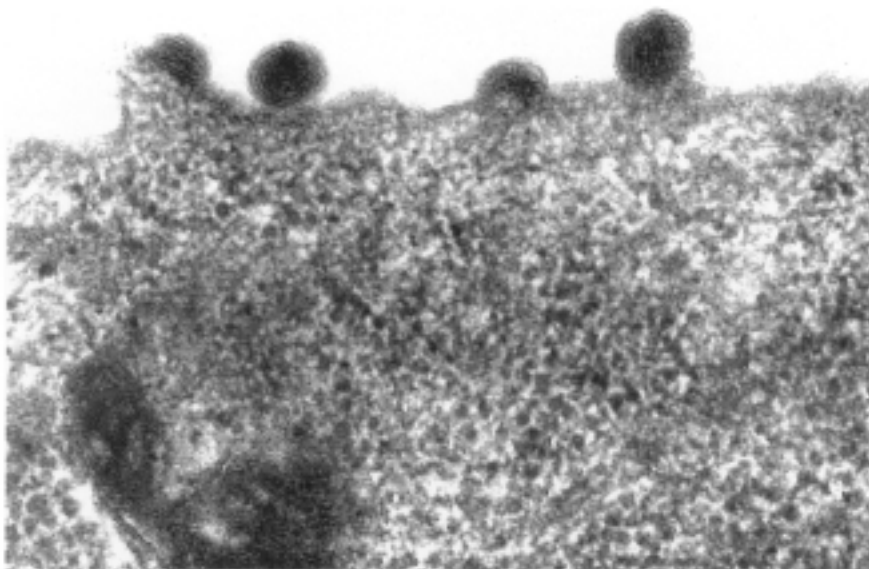


Figura 51

*Célula MMT. Figuras en huella digital a mayor aumento.
120.000x.*

cancerosas mamarias de ratón que poseíamos y que con certeza lo tenían, con objeto de analizar las relaciones entre los antígenos del cáncer mamario humano y los del MMTV.

En la sección de "Material y Métodos" se describen con detalle los procedimientos utilizados.

El aislamiento de virus de tumor mamario murino o MMTV se hizo a partir de adenocarcinoma mamario de ratón de la cepa insita C3H/He.

Siguiendo el procedimiento señalado, en la figura 52 y la tabla X se resumen los resultados del aislamiento y purificación del MMTV.

En la figura 53 se observa el resultado de la purificación del MMTV mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y en la figura 54 se registra el espectro de absorción del virus.

En promedio se obtuvieron 10,7 mg de proteínas con virus por gramo de tumor, o sea el 1,07 %, que contenían 0,40 μ g de partículas víricas. Estas sedimentan en dos picos, correspondientes a las densidades de 1,16 y 1,14 g/cc. El virus tiene su máximo espectro de absorción a una longitud de onda de 260 nm.

La infección vírica provoca un aumento de enzimas viroinducidas, como se ve en la tabla XI.

La cantidad de antígenos viroinducidos se modifica cuando los animales con adenocarcinoma mamario o las células de carcinoma mamario murino de diversas líneas mantenidas "in

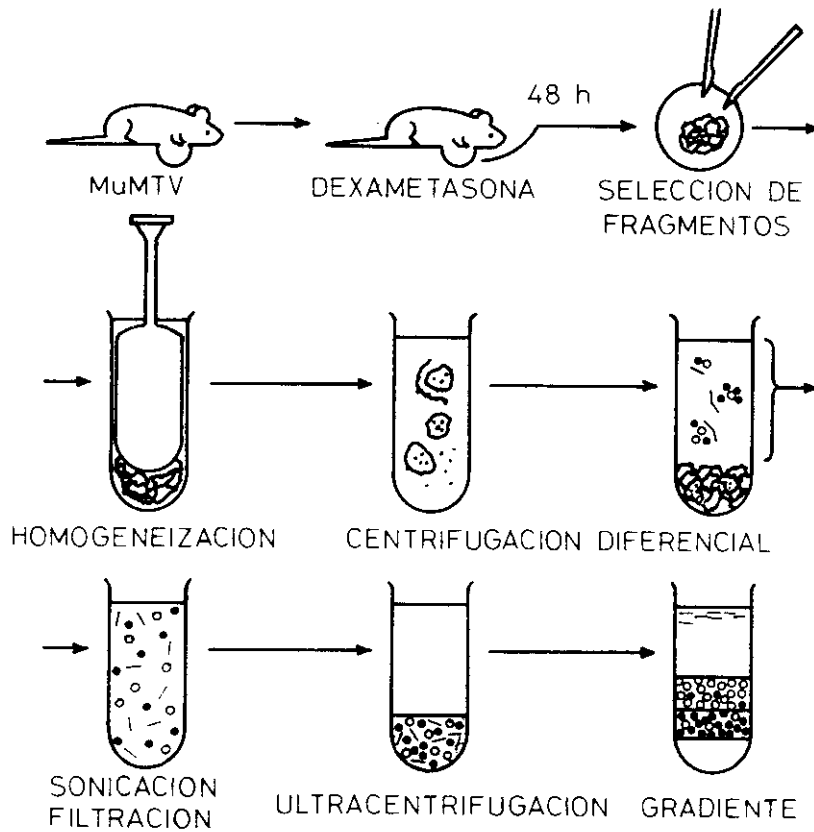


Figura 52

Esquema de aislamiento, concentración y purificación de MMTV

Nº de experimentos	5
Edad de los ratones	8 a 10 meses
Peso de los tumores	5 a 9 g
Volumen del homogenado filtrado	30 a 54 ml
Concentración media de nucleoproteínas	1,6 mg/ml
Cantidad media de MMTV a partir de tumores C3H/He	0,42 µg/g

Tabla X

Datos del aislamiento y concentración de MMTV a partir de adenocarcinomas mamarios de ratones C3H/He

	fosfatasa alcalina	fosfatasa ácida	fosfatasa prostática	lactico-deshidro genasa
Extracto acelular de adenocarcinoma mamario de ratón C3H/He	50	4,63	2,8	504
Fracción enriquecida en MMTV a partir del extracto acelular	189	18,6	9,3	79

Promedios de 5 experimentos
Los resultados se expresan en mU/mg

Tabla XI

Actividades enzimáticas del extracto acelular original
y de la fracción enriquecida en MMTV a partir del extracto

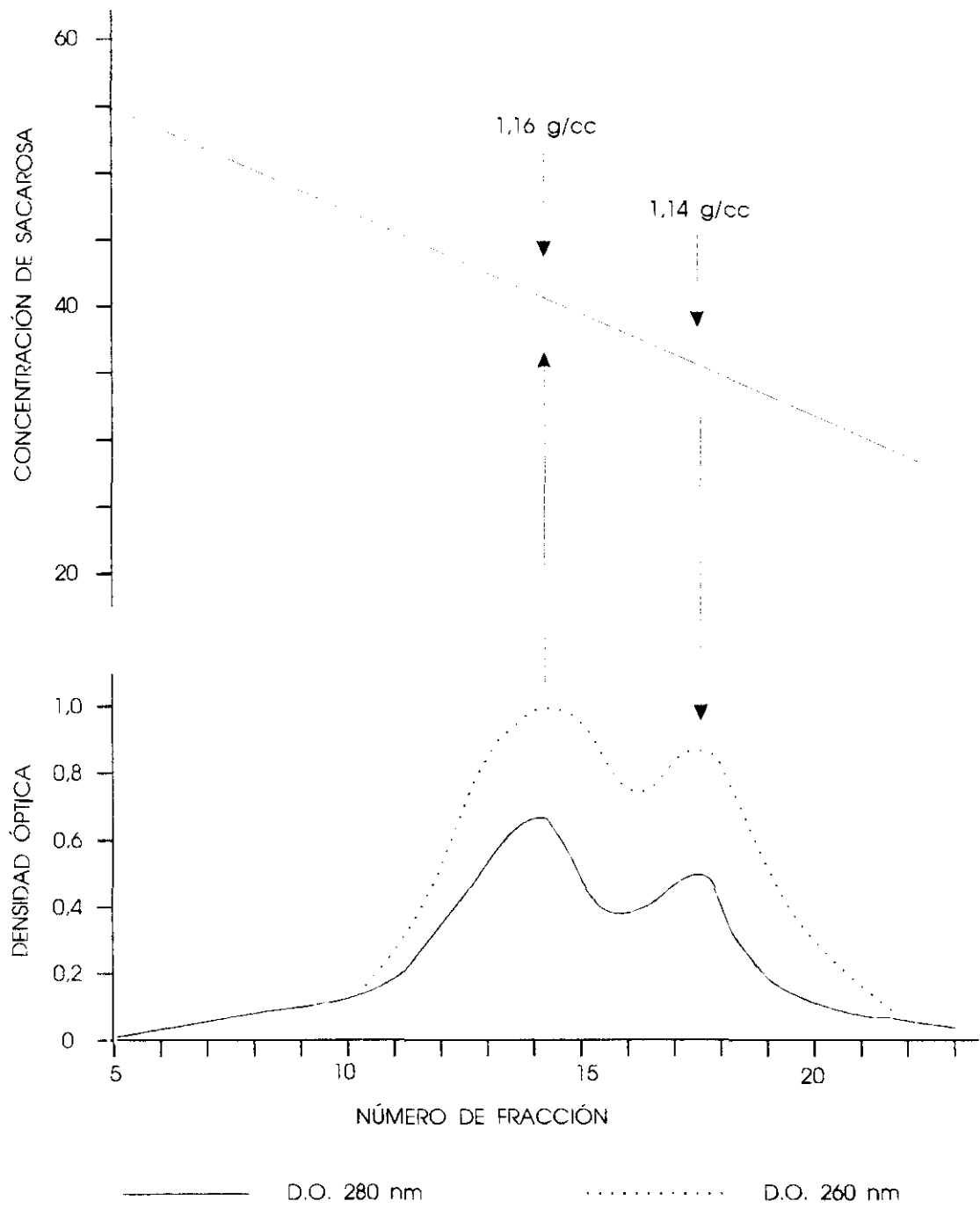


Figura 53
PURIFICACIÓN DE MMTV EN GRADIENTE DE SACAROSA

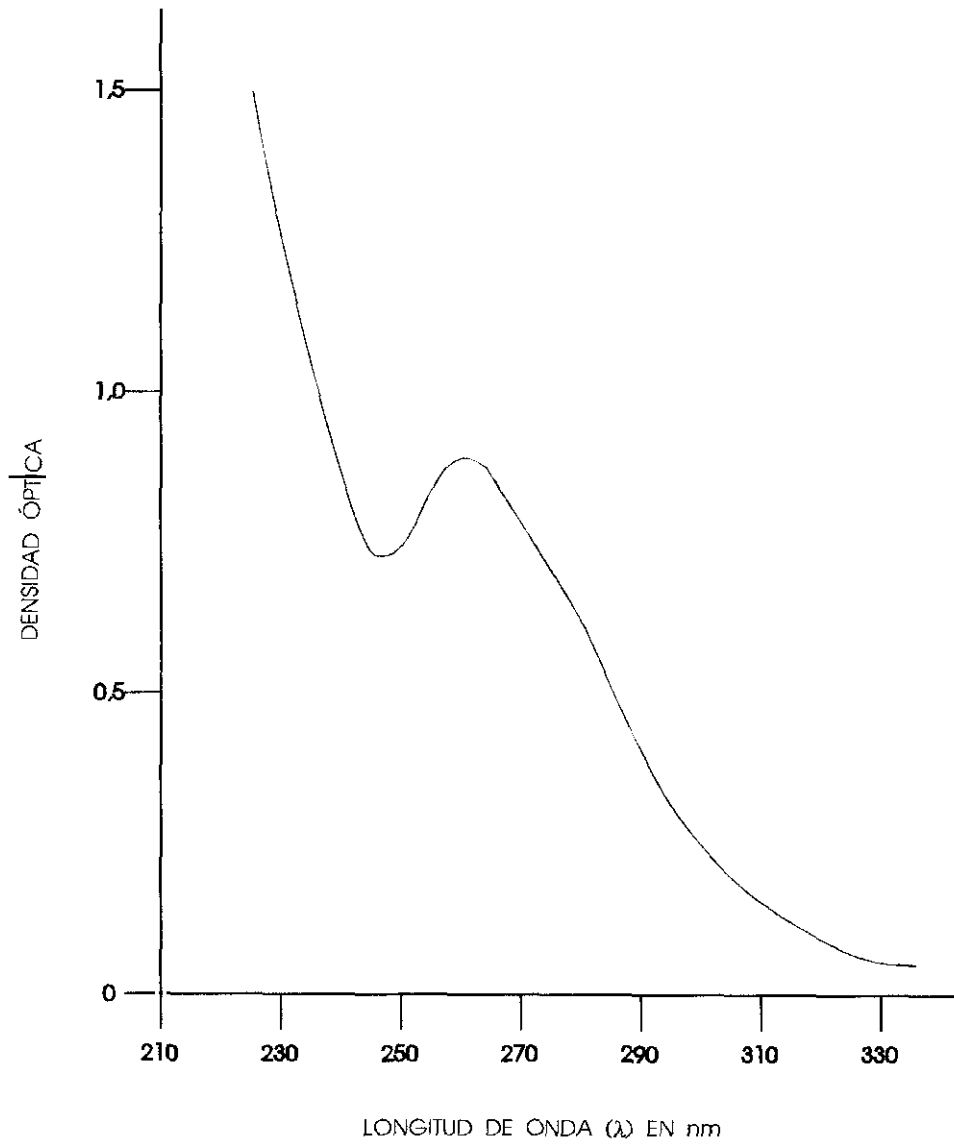


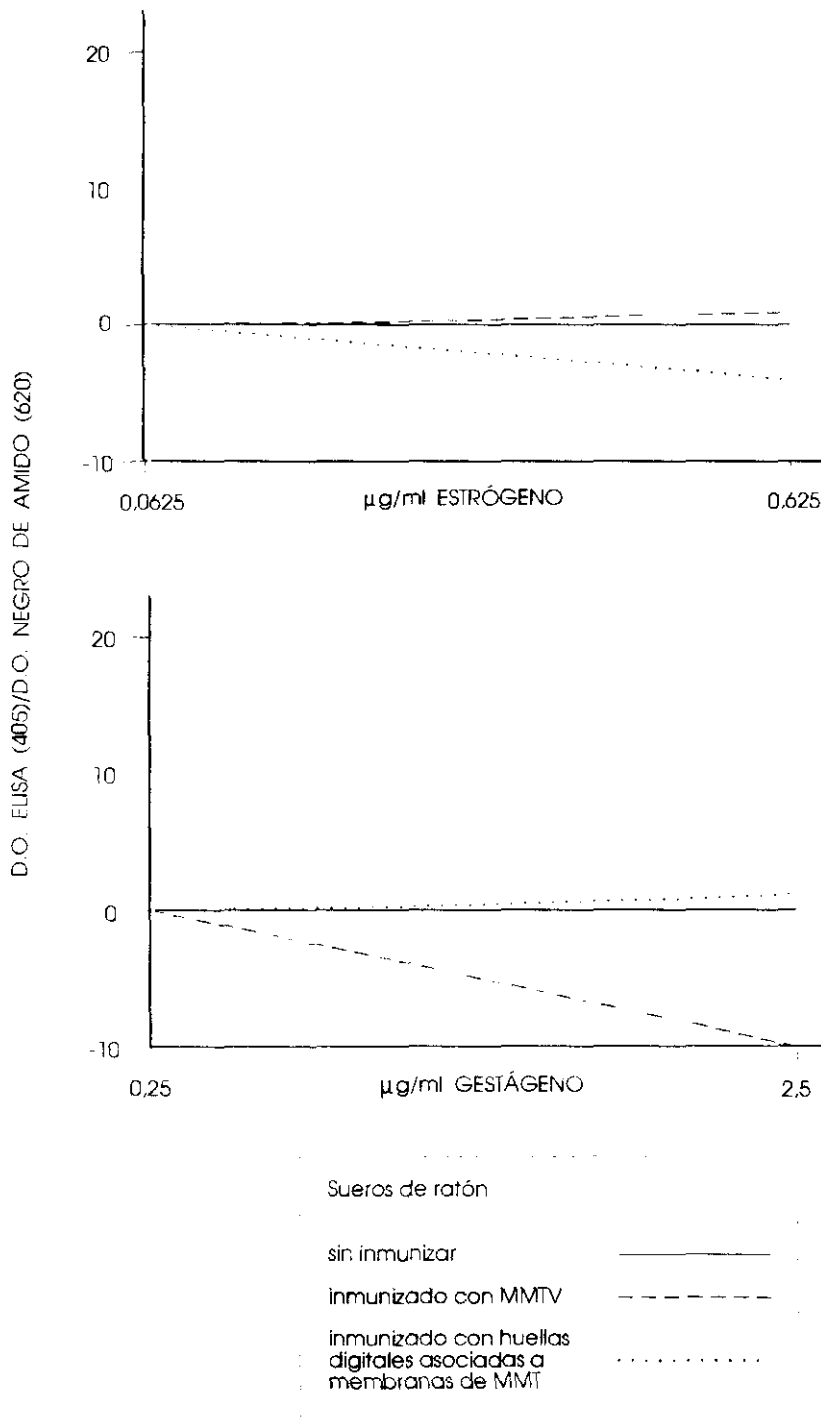
Figura 54
ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE MMTV

vitro" se tratan con estrógenos, gestágenos, andrógenos o corticosteroides (figuras 55, 56, 57 y 58) .

Una vez comprobada la existencia de relación antigénica cruzada entre células de cáncer mamario humano y murino y comprobado que la toxicidad de los SHu CaMa(+) desaparecía por absorción con células MMT o con membrana de las mismas, absorbimos el SHu CaMa(+) con MMTV purificado. Esto provocó la desaparición de la serotoxicidad del suero sanguíneo de las enfermas con cáncer mamario sobre las células MMT. Igualmente hacia disminuir la inmunofluorescencia.

En cuanto al efecto linfotóxico de los linfocitos de ratón sensibilizado por antígenos de células MMT, cuya acción depende de la adición de suero autólogo de ratón, desaparece cuando el suero se absorbe con MMTV, al igual que lo hacía cuando era absorbido con células MMT o sus membranas aisladas.

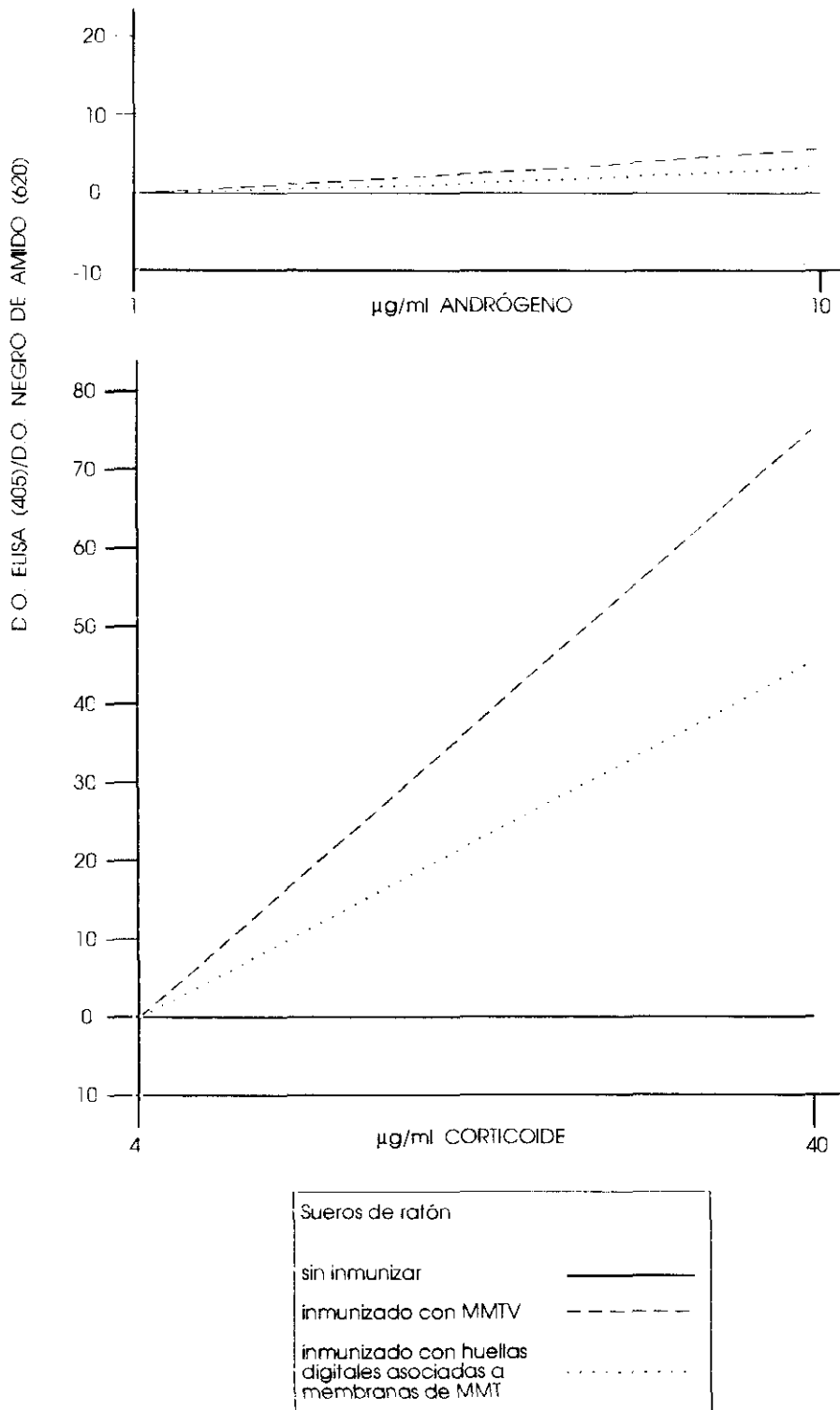
El examen conjunto de los datos reveló que en las pacientes con serotoxidad para las células MMT existía una correlación entre presencia y cantidad de anticuerpos anti-MMT y supervivencia (figuras 59 y 60).



Como estrógeno se utilizó valerianato de estradiol y como gestágeno caproato de hidroxiprogesterona

Figura 55

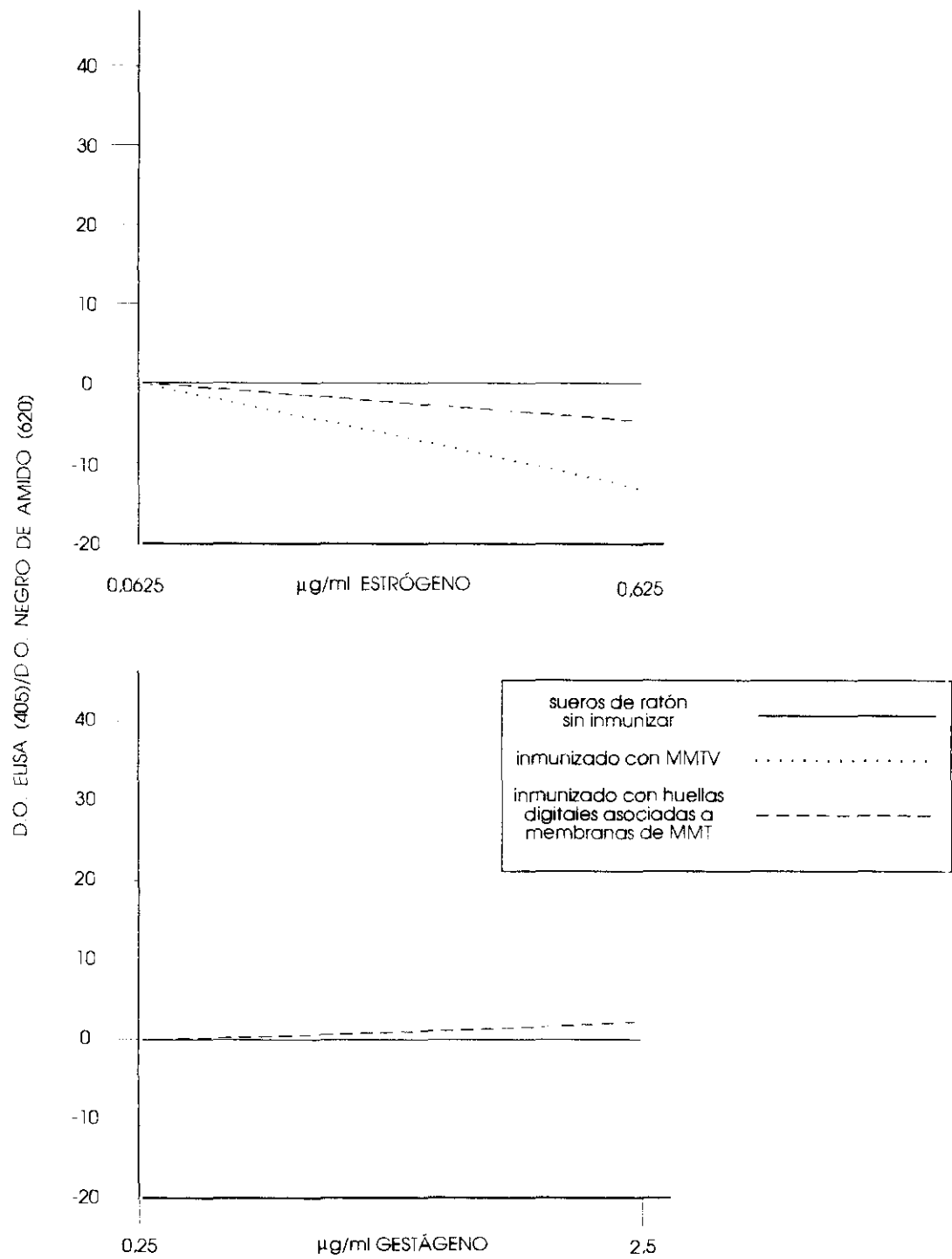
DETECCIÓN POR ELISA DE ANTÍGENOS VIROINDUCIDOS EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO DE RATÓN C3H/He, TRAS EL TRATAMIENTO CON ESTRÓGENO Y GESTÁGENO



Como andrógeno se utilizó propionato de testosterona y como corticoide dexametasona

Figura 56

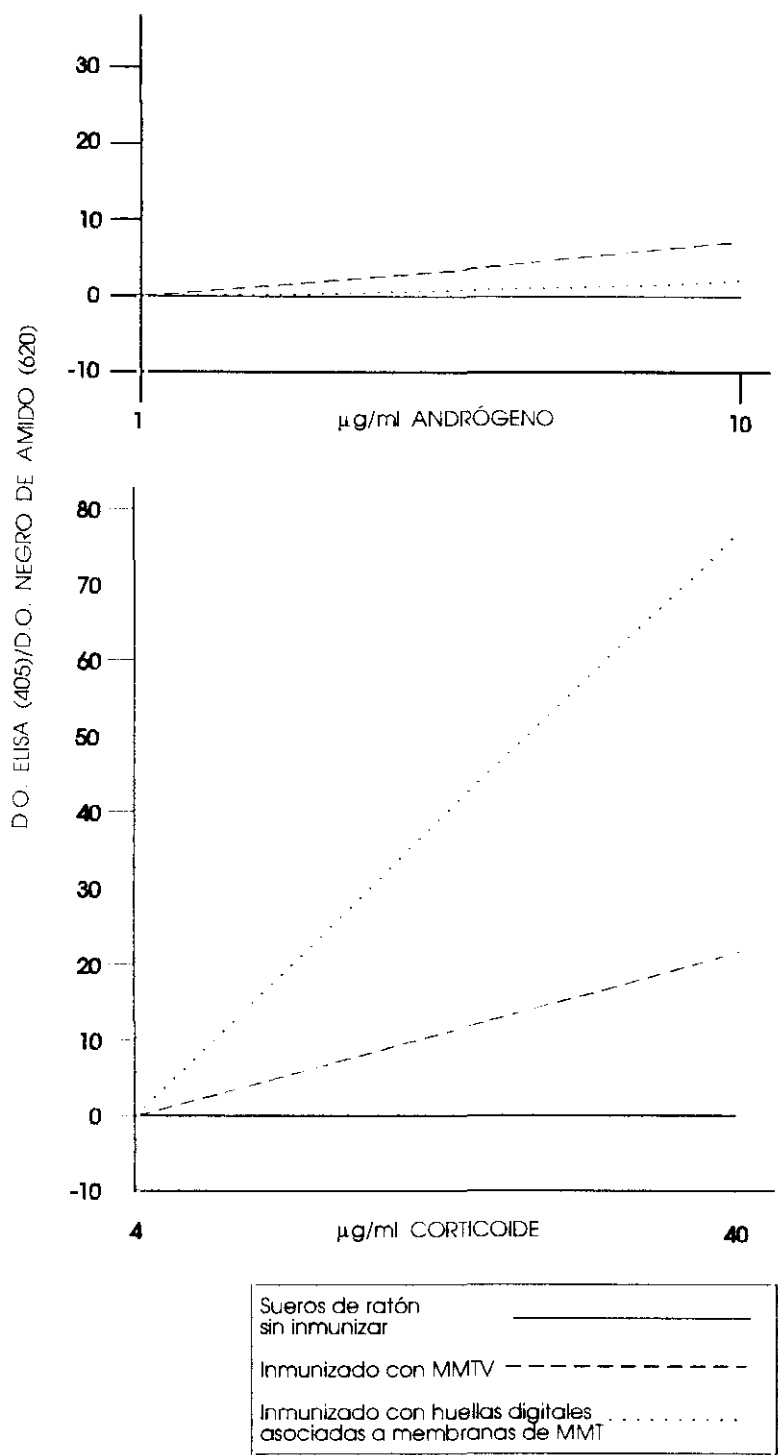
DETECCIÓN POR ELISA DE ANTÍGENOS VIROINDUCIDOS EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO DE RATÓN C3H/He, TRAS EL TRATAMIENTO CON ANDRÓGENO Y CORTICOIDE



Como estrógeno se utilizó valerianato de estradiol y como gestágeno caproato de hidroxiprogesterona

Figura 57

DETECCIÓN POR ELISA DE ANTÍGENOS VIROINDUCIDOS EN CÉLULAS MMT
TRAS EL TRATAMIENTO CON ESTRÓGENO Y GESTÁGENO



Como andrógeno se utilizó propionato de testosterona y como corticoide dexametasona

Figura 58

DETECCIÓN POR ELISA DE ANTÍGENOS VIROINDUCIDOS EN CÉLULAS MMT
TRAS EL TRATAMIENTO CON ANDRÓGENO Y CORTICOIDE

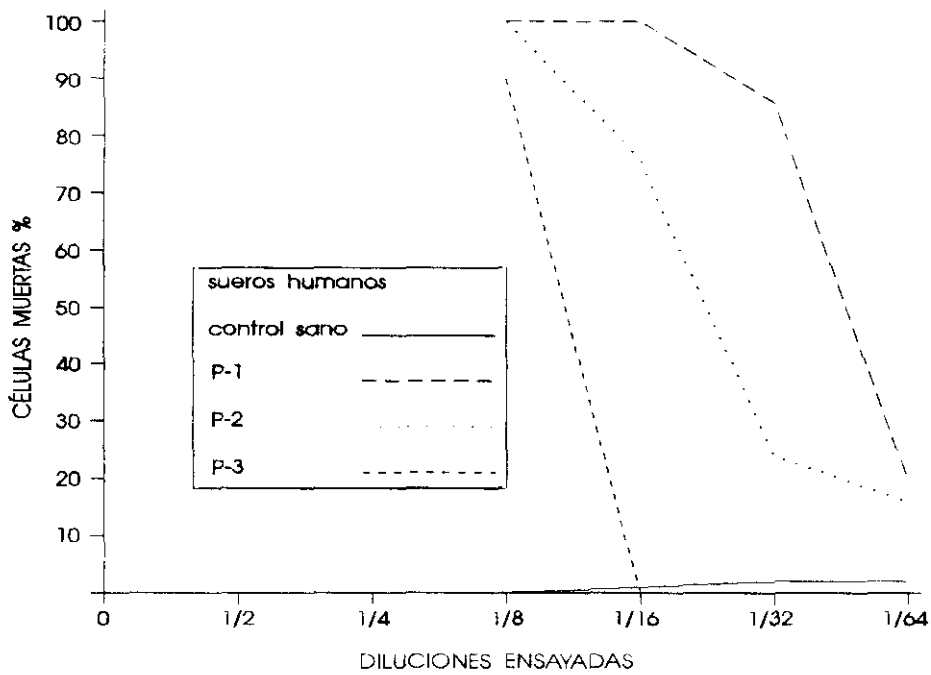


Figura 59

REACTIVIDAD HUMORAL SOBRE LAS CÉLULAS CANCEROSAS MAMARIAS C3H/He
(SEROTOXICIDAD)

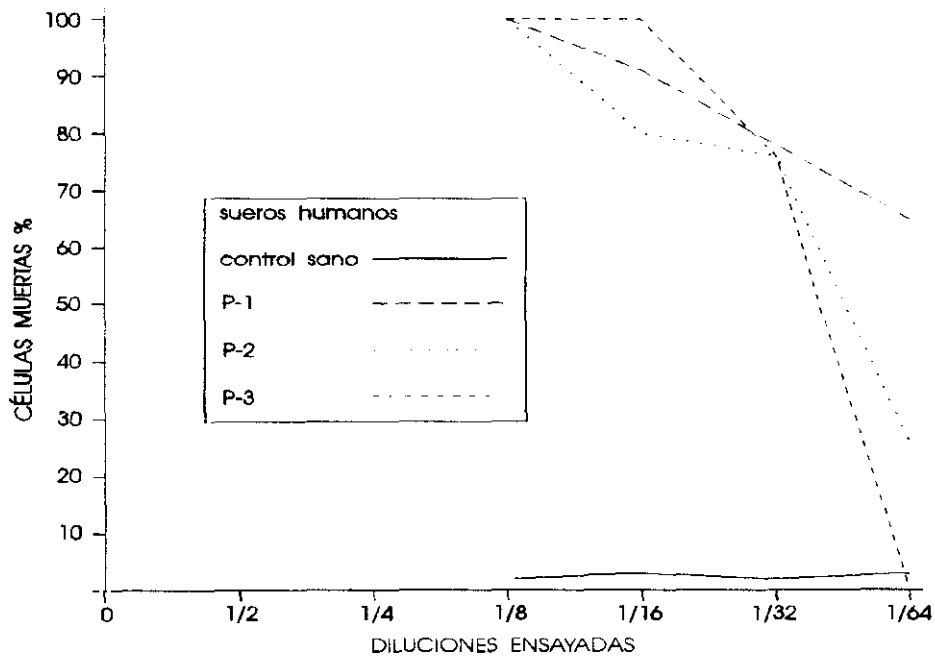


Figura 60

REACTIVIDAD HUMORAL SOBRE LAS CELULAS CANCEROSAS MAMARIAS MMT
(SEROTOXICIDAD)

V DISCUSION

V.A. INTRODUCCION

El virus del adenocarcinoma mamario murino (MuMTV o MMTV) es la causa principal del cáncer mamario en los ratones. Se trata de un retrovirus de tipo B. Por una parte, produce un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del ARN vírico por transcripción inversa, el cual se incorpora al genoma celular como provirus. Por otra parte, se reproduce dando lugar a partículas víricas vegetativas que se desprenden de las células productoras. No obstante, el MMTV no se manifiesta siempre en forma vegetativa.

En el apartado II.F.2.b. se describen los estudios de diversos autores en relación con este asunto.

Ya hemos mencionado que para este trabajo aislamos MMTV de los adenocarcinomas mamarios de ratones de la cepa C3H/He; en cambio, la sublínea celular MMT establecida "in vitro" a partir de un adenocarcinoma mamario de ratón no producía virus vegetativos, si bien, como han demostrado diversos autores, contiene secuencias de ADNc homólogo del ARN del MMTV. La línea MMT originalmente establecida producía MMTV, pero diversas sublíneas dejaron de ser productivas.

El MMTV ha sido aislado de leche de ratones con incidencia tumoral elevada, explantes de tumores mamarios productores,

células epitelioides establecidas "in vitro" a partir de tumores mamarios de diversas cepas de ratón y líneas celulares epiteliales heterólogas infectadas o inoculadas con MMTV (buen modelo para estudiar las primeras fases de la infección y de gran infectividad en los 2-3 primeros pases).

Diversos virus oncogénicos de tipo ADN y ARN provocan la transformación cancerosa de la célula a través de oncogenes (v-onc). Algunos contienen, además de oncogenes, genes promotores de la actividad de los oncogenes, tanto víricos (v-onc) como celulares (c-onc) homólogos.

Pero existen virus que carecen de oncogenes y tienen únicamente genes con secuencias de ADN promotoras, que activan a los oncogenes celulares. Tal es el caso del MMTV, que no tiene oncogenes pero posee la secuencia LTR (por "long terminal repeat" o secuencia terminal larga repetida), que induce la amplificación o sobre-expresión de ciertos oncogenes celulares.

En los experimentos de Crespin y col (1984), el análisis de ADN de tejido de carcinoma mamario obtenido quirúrgicamente, fragmentado con la enzima de restricción Eco RI, mostró en dos de 28 casos una región homóloga de la región LTR-gag ("long terminal repeat plus group antigen" del MMTV y región de la proteína gag de cubierta o Env del mismo). Los linfocitos de las pacientes "positivas" se cultivaron en presencia de IL-2 (interleuquina 2), obteniéndose abundantes células T. El ADN de las células T de los cultivos de tres días contiene secuencias de MMTV. El ADN de linfocitos de sujetos normales no contiene

secuencias de MMTV.

La unidad II de la mitad 3' del LTR del provirus de MMTV en el ratón C3H tiene una homología de 93,4 % con la parte correspondiente de la LTR del virus exógeno de C3H (Donehower, Fleurdelys y Hager, 1983). El LTR endógeno conserva todos los recuadros grandes de lectura abierta del LTR exógeno. Las diferencias en la secuencia no se llevan a cabo al azar, originando estructuras silenciosas.

Mukherjee y col (1973) vieron un aumento de la actividad de la transcriptasa inversa en la glándula mamaria normal en desarrollo, en tejido tumoral mamario sin virus y en glándula mamaria lactante.

Desde luego, el factor vírico no es el único que interviene en la carcinogénesis mamaria del ratón.

Ringold (1979) ya observó que la tumorigénesis mamaria en los ratones depende del medio hormonal, produciéndose casi exclusivamente en hembras, siendo la tasa de crecimiento tumoral mayor durante la preñez, así como en machos tratados con hormonas femeninas.

El tratamiento con hormonas esteroideas y polipeptídicas aumenta la incidencia tumoral; lo mismo sucede con el incremento de la producción de hormonas adrenocorticales. Los receptores para corticoides y esteroides sexuales están presentes en los tumores mamarios y en las glándulas mamarias lactantes.

Se ha visto que las hormonas glucocorticoideas estimulan

la producción de virus 10-20 veces, aun en ausencia de suero, en líneas establecidas a partir de tumores mamarios de ratón y aumentan los cuerpos de inclusión citoplásmicos (los cuales se deben a MMTV o a partículas A) en tumores mamarios murinos, situación que también nosotros observamos en las células de cultivo primario de adenocarcinoma mamario murino tratadas con glucocorticoides figuras 47 y 48.

Así mismo, diversas hormonas polipeptídicas (insulina, prolactina, hormona de crecimiento, factor lactógeno placentario) estimulan la producción del virus.

Se ha demostrado que la producción de virus inducida por los corticoides va precedida de un rápido e importante ascenso de los niveles de ARN vírico intracelular. Todas las células susceptibles a este estímulo presentaban receptores citoplásmicos para glucocorticoides, que parecen ser los mediadores del estímulo de la expresión de los genes MMTV.

La región HERV-K del genoma humano se considera un retrovirus endógeno homólogo del genoma del MMTV. La región genómica HERV-K transcribe un ARN poli(A)+ de 8,8 kb. En las células de la línea T47D, de carcinoma mamario humano, el tratamiento con estradiol seguido de progesterona aumenta la expresión de HERV-K (Ono, Kawakami y Ushikubo, 1987).

Darbre y col (1984) estudiaron la línea de carcinoma mamario S115 de ratón, andrógeno-dependiente, a partir de la cual obtuvieron una línea andrógeno-independiente por selección de las células que crecían en ausencia de andrógenos. En las

células andrógeno-independientes los andrógenos no fueron capaces de cambiar la morfología celular, estimular el crecimiento y aumentar la cantidad de ARNm de LTR de MMTV. Se observó un aumento en estas células de la metilación del ADN a nivel de las secuencias MMTV-LTR, a lo cual se atribuyó la hormono-independencia.

En las células de carcinoma mamario andrógeno-dependientes, tanto los andrógenos (testosterona) como los glucocorticoides (dexametasona) estimulan la producción de células con morfología fibroblástica, la densidad de saturación en monocapa y el crecimiento en suspensión (Darbre y col). La fase de crecimiento logarítmico es estimulada por los andrógenos e inhibida por los glucocorticoides.

Nosotros observamos que en las células de cánceres mamarios murinos, como MMT y C3H, el tratamiento con hormonas esteroideas modifica la expresión de antígenos viroasociados (figuras 55 a 58.).

El estudio del efecto de andrógenos y glucocorticoides por transfección mostró que los cambios morfológicos y el estímulo de la proliferación por parte de los andrógenos no se producen a la vez, sino independientemente.

Todas las poblaciones neoplásicas, aunque sean tumores monoclonales en su origen, acaban teniendo fenotipos muy diferentes. En los tumores originalmente hormono-dependientes desarrollan subpoblaciones con diversos grados de sensibilidad

y subpoblaciones hormono-independientes.

Aunque se ha descrito la presencia de partículas de aspecto vírico en el tejido de carcinoma mamario humano y en la leche de las pacientes, se discute si es un verdadero virus y si participa en la etiopatogenia del cáncer de mama.

La verdad es que la mayor parte de las veces no se detectan virus, ni es necesario que se detecten para que estén relacionados con la transformación neoplásica, pues es bien sabido que los virus oncogénicos no siempre se expresan en forma vegetativa, pero existen provirus que se reproducen como parte del genoma celular y ejercen una acción cancerígena. E incluso zonas genómicas con ADN sin aparente relación con virus que es homólogo del ADNc que produciría el ARN de un retrovirus oncogénico.

Los ratones de la cepa C3H tienen una elevada incidencia de adenocarcinomas mamarios por transmisión láctea (transmisión horizontal de virus maduros) y por transmisión vertical (por virus vegetativos o episomas en las células sexuales o por el provirus de MMTV incorporado a la cromatina). En dichos ratones existen antígenos tumor-asociados, antígenos viro-informados (que corresponden a enzimas y otras proteínas codificadas por el genoma vírico y que forman parte de las partículas víricas) y antígenos viro-inducidos (que son proteínas celulares inducidas por el virus, pero que no forman parte de las partículas víricas). Las proteínas viro-inducidas son enzimas y otras sustancias necesarias para la multiplicación del virus.

Las líneas celulares establecidas "in vitro" a partir de células de carcinomas mamarios murinos, como la línea celular MMT, poseen también antígenos tumor-asociados, antígenos viro-informados y antígenos viro-inducidos. Y existe expresión de antígenos víricos aunque se trate de sublíneas que han perdido la capacidad de producir virus y contienen solamente provirus.

Nosotros encontramos que, independientemente de la existencia de partículas víricas vegetativas, se puede observar que el tejido de carcinoma mamario humano contiene antígenos que dan reacciones cruzadas con antígenos de los tejidos de carcinoma mamario murino y con antígenos del MMTV. Esto se debe a que el genoma de las células de cáncer de mama humano contiene secuencias génicas homólogas del MMTV. El suero sanguíneo de las pacientes posee anticuerpos que reaccionan con antígenos de las células de cáncer mamario murino y con el propio MMTV. La citólisis cancerosa por anticuerpos es casi siempre complemento-dependiente.

Nuestros resultados coinciden con diversos estudios realizados por otros autores que han mostrado que existen reacciones inmunológicas cruzadas entre el carcinoma de mama humano por una parte, y el carcinoma mamario murino de varias cepas de ratones y el retrovirus causal por otra.

Mediante métodos inmunológicos, se han realizado varios descubrimientos:

- Se han visto relaciones serológicas entre las proteínas y genoma del MMTV y las proteínas, genoma y ARN de los tejidos

de carcinoma mamario humano.

- Las células de cáncer de mama humano y el MMTV producen un factor de inhibición de la migración de los linfocitos humanos (Black y col, 1974).

Las células del cáncer de mama humano presentan antígenos emparentados con un antígeno del MMTV y con la proteína estructural p27 del virus de Mason-Pfizer del mono (Yeh y col, 1975).

- El suero sanguíneo de mujeres con cáncer de mama contiene anticuerpos que neutralizan al MMTV (Charney y Moore, 1971).

Las inmunoglobulinas del suero sanguíneo de mujer con cáncer de mama reaccionan con antígenos presentes en las células de ratón en las que se multiplica el MMTV, como se registra por inmunofluorescencia indirecta (Müller, Hageman y Daams, 1972; Müller y col, 1973; Priolri y col, 1973) y con el método de la inmunoperoxidasa al microscopio electrónico (Hoshino y Dmochowski, 1973).

Newgard, Cardiff y Blair (1976) han sembrado la duda de que pudiera tratarse de reacciones inespecíficas.

Litinov y Golovkina (1989) señalaron que las líneas celulares MCF-7 y T47-D expresan un antígeno relacionado inmunológicamente con una gp52, uno de los productos codificados por el gen gag del MMTV. No todas las células lo expresan, incluso en poblaciones clonales de ellas. Las células MDA-231 y las células epiteliales de la leche de mujeres sanas

no tienen antígenos similares a los del gag del MMTV. En las células normales de la mama hay p27, otra proteína del MMTV. No obstante, existen genes víricos no expresados, incluyendo el gen gag.

El ADN del carcinoma de mama humano contiene con frecuencia secuencias homólogas a los de la región gag-pol del MMTV. En el 6% de los casos existen también secuencias homólogas de la región LTR del MMTV, de las que hay unas cinco copias (Westley y May, 1985).

Los linfocitos de un ganglio axilar con metástasis en una enferma con carcinoma ductal infiltrante de mama se fusionó con una línea de células linfoblastoides humana y se aislaron nueve líneas de hibridomas. Las células tumorales de la paciente tenían antígenos que daban reacción cruzada con los antígenos del MMTV (Schoenfeld y col, 1987). El suero de la paciente y los anticuerpos monoclonales de sus hibridomas reaccionaron con antígenos del MMTV y pueden servir precisamente para su reconocimiento.

Major y col (1987) consiguieron diez anticuerpos monoclonales de ratón que reaccionan con antígenos que expresan las células del carcinoma mamario en gran cantidad en el citoplasma y en la superficie celular y en pequeña cantidad en la superficie de células normales de la glándula mamaria.

Los diez anticuerpos monoclonales reconocen seis epitopos. Ocho de los diez reconocen una proteína de 300.000 Da. Seis de diez reaccionan con una proteína de 280.000 Da.

Siete de diez reconocen a un antígeno de 330.000 Da de la membrana de los glóbulos grasos de la leche de tejido normal.

No todos los tumores tienen cantidades aumentadas de los antígenos en cuestión; 80% de los tumores reaccionan con tres de los anticuerpos y porcentajes menores con otros tres. Muchas células de las metástasis contienen los mismos antígenos.

Dion y col (1987) analizaron las proteínas estructurales gp55, gp34, p28, p18 y p12 del MMTV de la leche de ratones de la cepa RDDI, registrando que solamente la p18 reaccionaba con el suero humano.

V.B. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Vamos a examinar, uno por uno, los resultados obtenidos, porque presentan varios aspectos que deben ser interpretados unos a la luz de otros.

Primera serie de observaciones. Sueros tóxicos y no tóxicos.- Posibilidad de distinguir sueros sanguíneos de pacientes con carcinoma de mama con acción tóxica sobre las células de adenocarcinoma mamario murino MMT, o SHu CaMa(+), y sueros sanguíneos sin tal carácter serotóxico o SHu CaMa(-).

Demostración por:

- a) degeneración y muerte de las células MMT,
- b) existencia de antígenos de MMT que reaccionan con anticuerpos del SH CaMa(+), demostrados por hemadsorción con hematíes cubiertos de

inmunoglobulinas de conejo contra inmunoglobulinas humanas, inmunofluorescencia, absorciones, elisión e inmunodifusión.

Segunda serie de observaciones. Efecto de las inmunoglobulinas de los sueros sanguíneos humanos tóxicos, SHu CaMa(+). - Registro de que las inmunoglobulinas del SHu CaMa(+) tienen diferente acción aisladamente o cuando están en el suero.

Demostración por:

- a) producción de zeiosis con recuperación celular,
- b) propiedades de las células MMT post-zeióticas precoces y tardías

Tercera serie de observaciones.- Sueros diferenciadores y no diferenciadores.- Posibilidad de distinguir sueros sanguíneos de pacientes con carcinoma de mama que inducen la diferenciación glandular mamaria en las células MMT, y sueros sanguíneos sin actividad diferenciadora.

Demostración por:

- a) manifestaciones de diferenciación pseudoglandular,
- b) caracterización de los factores de diferenciación glandular mamaria (FDGM).

Cuarta serie de observaciones.- Efectos de los linfocitos inmunizados.-

- a) características de la linfotoxicidad de los linfocitos de ratones inmunizados con células

MMT, sobre las células MMT,

- b) Tropismo de los linfocitos de mujer con carcinoma de mama sobre las células MMT

Quinta serie de observaciones. Estudio de las relaciones inmunológicas cruzadas entre el carcinoma ductal infiltrante de mama humano y el adenocarcinoma de mama murino.-

Demostración por:

- a) reacciones entre anticuerpos de pacientes y antígenos de células MMT, (toxicidad, inmunofluorescencia),
- b) inhibición de las reacciones toxicidad, inmunofluorescencia) absorbiendo con células MMT, membranas de las mismas, formaciones en huella digital o MMTV,
- c) formación de inmunocomplejos híbridos,

V.B.1. SUEROS TOXICOS Y NO TOXICOS

Los sueros sanguíneos humanos procedentes de pacientes con cáncer de mama pueden dividirse, en función de su serotoxicidad sobre las células MMT, en sueros citotóxicos y sueros no citotóxicos, abreviados SHu CaMa(+) y SHu CaMa(-), respectivamente.

Dichos efectos se distribuyen de la siguiente manera. El suero sanguíneo del 57,9 % de las enfermas con carcinoma

mamario presenta acciones tóxicas sobre las células MMT, en tanto que el suero sanguíneo del 42,1 % de las pacientes no manifiesta dicho efecto.

Mediante inmunofluorescencia se pudo observar que los factores serotóxicos son anticuerpos humanos que reaccionan con antígenos de las células MMT. Es decir, que existen reacciones inmunológicas cruzadas entre las células cancerosas humanas y murinas.

El efecto serotóxico sobre las células MMT no lo presentan los sueros sanguíneos de las mujeres sanas no embarazadas ni los sueros de mujeres embarazadas.

El efecto serotóxico es complemento-dependiente, ya que desaparece tras la inactivación a 56° C durante 30 minutos. Ello demuestra también que el factor serotóxico es termoestable, ya que no se destruye a dicha temperatura.

Se trata pues de una reacción humoral cruzada de anticuerpos termoestables dependientes del complemento.

Fue una sorpresa encontrar que el suero sanguíneo de los ratones inmunizados con células MMT, que es necesario para que los linfocitos de ratón ejerzan su actividad citotóxica, no es tóxico por sí mismo para las células MMT, o sea, que el suero de los ratones inmunizados que han rechazado en su organismo un tumor por inoculación de células MMT no es serotóxico.

Pero no solamente esto, sino que, además el suero de ratones inmunizados protege a las células MMT de la citotoxicidad mostrada por los sueros humanos tóxicos.

Por consiguiente: a) El suero sanguíneo de algunas pacientes con carcinoma mamario es citotóxico para las células MMT de carcinoma mamario murino. b) Contrariamente, el suero sanguíneo de los ratones inmunizados con células MMT, no es citotóxico para las células MMT. c) Pero el suero no citotóxico de los ratones inmunizados inhibe la acción citotóxica del suero de las pacientes sobre las células MMT. Estos hechos podrían interpretarse como una competencia entre los anticuerpos no citotóxicos de los ratones y los anticuerpos citotóxicos de las pacientes por los mismos determinantes antigénicos o epitopos de las células MMT. Cuando los anticuerpos murinos no tóxicos se fijan a la célula bloquean la unión de los anticuerpos humanos tóxicos.

Cuando se observó el efecto de las inmunoglobulinas puras obtenidas de sueros tóxicos y se comparó su acción con la de los sueros tóxicos enteros, se registraron variaciones de la actividad tóxica.

Las células MMT se incubaron con sueros de mujeres sanas, sueros de pacientes con cáncer de mama y suero normal suplementado con inmunoglobulinas aisladas de sueros tóxicos de enfermas con cáncer de mama. Las inmunoglobulinas se añadieron a una concentración equivalente a la existente en el suero.

Se observó que el suero normal suplementado con inmunoglobulinas de suero tóxico producía cambios morfológicos evidentes en las células MMT, con liberación de múltiples fragmentos zeióticos sin signos degeneración celular, seguida

de una recuperación celular total.

Pensamos que si el suero entero es tóxico para las células MMT, y por inmunofluorescencia habíamos demostrado que se trataba de inmunoglobulinas, en tanto que las inmunoglobulinas obtenidas del suero tóxico no son citotóxicas, la acción lítica de las inmunoglobulinas sobre las células cancerosas necesita de un factor activador presente en el suero. Alternativamente, podría tratarse a una concentración insuficiente de complemento.

Cuando se añadieron inmunoglobulinas aisladas del suero de mujeres sanas, embarazadas o no embarazadas, no se produjo ningún efecto.

Tampoco se produjo zeiosis cuando se expusieron células embrionarias normales (control) a los sueros suplementados con inmunoglobulinas purificadas a partir de sueros tóxicos.

Los experimentos realizados mostraron que los fragmentos zeióticos liberados contenían inmunocomplejos, o sea, inmunoglobulinas combinadas con antígenos. Aislamos anticuerpos de las vesículas zeióticas y de las células enteras mediante tratamiento ácido con buffer de glicina-HCl a pH 2,8.

V.B.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS REACTIVAS

Como hemos mencionado, tuvimos importantes dificultades técnicas para conseguir que el tratamiento con el buffer de glicina-HCl no produjese la muerte de las células:

Observamos que la elución de inmunoglobulinas de células vivas empleando el medio habitual de glicina ácida en soluciones salinas isotónicas producía una muerte rápida y total de las células. Esto era un obstáculo que impedía utilizar las células después de la separación de las inmunoglobulinas de la superficie. En la literatura científica es relativamente frecuente ver publicados resultados de experimentos en sistemas semejantes, que no reconocieron la muerte celular, por lo cual deben quedar sistemáticamente invalidados.

Cuando intentábamos restablecer el pH neutro nos encontrábamos que no era posible, dada la rapidez con que se producía la muerte celular.

Buscando un procedimiento que conservara la viabilidad celular, estudiamos el efecto de modificar la tonicidad del buffer ácido empleando distintas concentraciones de sacarosa.

Encontramos que a los 9 minutos de tratamiento no sobrevive ninguna célula en presencia de glicina en solución salina isotónica o de glicina en sacarosa 0,27 M; la supervivencia era del 1 % utilizando sacarosa 0,512 M, 20 % empleando sacarosa 0,88 M y 72 % con sacarosa 1,49 M. Esta viabilidad del 72 % para tiempos de exposición de 9 a 14 minutos (tabla VIII), alcanzó el 90 % para una exposición de 7 minutos, empleando sacarosa 1,49, hipertónica (tabla IX). Los mejores resultados se obtuvieron, por lo tanto, con buffer de glicina-HCl a pH 2,4 preparado con solución hipertónica de

sacarosa 1,49 M.

En suma, el aumento de la tonicidad del medio ocasionado por el incremento en la molaridad de la sacarosa no modificó la eficiencia de la elución de inmunoglobulinas de la membrana plasmática, a la vez que permitió disponer de una elevada proporción de células viables.

Cuando las células tratadas con el buffer ácido a pH 2,4 en sacarosa 1,49 M eran neutralizadas a pH 7,0, lavadas con solución salina fosfatada de Dulbecco y cultivadas en el medio de crecimiento habitual, mostraron una viabilidad a largo plazo y una curva de crecimiento normales (figura 23).

Las células MMT tratadas a pH ácido con sacarosa, después de subcultivarlos, presentan la misma sensibilidad y respuesta, a los distintos sueros, que las células MMT nativas.

Para estudiar la participación de las inmunoglobulinas en el efecto citotóxico, analizamos su fijación a la membrana celular. Se incubaron células MMT con suero tóxico de enfermas con cáncer de mama; antes de que la degeneración celular se produjese, las células se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos de Dulbecco (PBS) y las inmunoglobulinas fijadas a la membrana celular fueron eluidas con glicina-HCl a pH 2,4 en sacarosa.

Mediante inmunodifusión radial cuantitativa se confirmó la presencia de inmunoglobulinas en el material eluido. Para realizar la prueba, el eluato se concentró previamente cien veces mediante un microconcentrador Minicon B-15. Se utilizaron

4,7 μg de inmunoglobulinas. La inmunoelectroforesis mostró la presencia de IgG únicamente, y la ausencia de IgA, IgD e IgM.

No obstante, el producto eluído contenía otras proteínas, además de las inmunoglobulinas.

La cantidad total de proteínas eluídas se valoraron espectrofotométricamente aplicando la fórmula $(E_{215\text{nm}} - E_{227\text{nm}}) \times 144$ x factor de dilución = $\mu\text{g/ml}$ de proteínas en la solución original.

La cantidad de proteínas eluídas fue de 1,7 $\mu\text{g}/10^6$ células en las muestras tratadas con el buffer de glicina-HCl a pH 2,4 en sacarosa 0,27 M, y 2,3 $\mu\text{g}/10^6$ células cuando se utilizó buffer de glicina-HCl a pH 2,4 en sacarosa 1,49 M (hipertónica).

Ahora bien, cuando se midió espectrométricamente la relación $E_{278\text{nm}}/E_{251\text{nm}}$ se obtuvieron valores entre 1,21 y 1,47, en vez de los valores 2,4 a 2,8 que son propios de las inmunoglobulinas puras. Esto se debe evidentemente a la presencia de proteínas de la membrana donde existen proteínas reactivas.

Las inmunoglobulinas purificadas a partir de los fragmentos zeioticos o de las células MMT enteras ensayadas sobre células MMT, repetían el efecto descrito para los SHu CaMa(+) inactivados y para las IG purificadas obtenidas de los mismos: produciendo vesículas zeioticas sin acción lítica sobre las células cancerosas.

En el suero de las pacientes y en el de los ratones con

cáncer de mama existen también inmunocomplejos circulantes. Empleando una técnica de nuestro laboratorio (Castellanos y col, 1985), determinamos la cantidad de inmunocomplejos circulantes en las fases clínicas iniciales y avanzadas del carcinoma ductal infiltrante de mama. En el cáncer inicial se encontraron 1,1 μg equivalentes de inmunoglobulina humana agrega y en los estadios avanzados 9,3 μg .

En el grupo de mujeres sanas utilizadas como control, la cantidad de inmunocomplejos fue de $1,14 \pm 0,72 \mu\text{g}$ equivalentes de inmunoglobulina humana agregada.

La evolución del cáncer de mama se correlacionó con la cantidad de inmunocomplejos circulantes (tabla XII).

V.B.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENCIACION GLANDULAR

MAMARIA

Por su efecto sobre la evolución de los cultivos de células MMT "in vitro", se pueden distinguir dos tipos de sueros sanguíneos en las pacientes con cáncer de mama: sueros con efecto de diferenciación glandular mamaria y sueros sin efecto de diferenciación.

Esta observación se complementa con otras dos: la primera, los sueros de ternera adulta recién nacida, bovino fetal o caballo no manifiestan efecto de diferenciación glandular mamaria sobre las células MMT de ratón; la segunda, que los sueros de mujeres sanas no embarazadas producen efecto

diferenciador en menor número y con menor intensidad que los sueros de las mujeres embarazadas no estudiamos la posible correlación de la situación hormonal de la mujeres no embarazadas en relación con el ciclo menstrual.

Los sueros de las embarazadas produjeron marcada diferenciación en todos los casos.

Las pacientes cuyos sueros no exhibieron toxicidad sobre las células MMT presentaron efecto diferenciador en el 75 % de los casos.

Las pacientes cuyos sueros exhibieron toxicidad no pueden valorarse en las mismas condiciones, ya que el efecto diferenciador hubo de ensayarse tras la inactivación de estos sueros y en estas condiciones presentaron efecto diferenciador el 27,3 %.

Como se dijo, la diferenciación se reconoció por el agrupamiento pseudotisular de casquetes esféricos que histoquímicamente, con colorante Sudán III, mostraban abundante contenido lipídico.

Registramos que cuando se calentaba el suero a 56° C durante 30 minutos el efecto de diferenciación no era inhibido y que, por lo tanto, se trataba de un factor termoestable.

A la vez, la destrucción térmica del complemento en el suero no impedía la acción del efecto de diferenciación, lo que indicó que se trataba de un factor de diferenciación glandular mamaria (FDGM), independiente del complemento.

El fraccionamiento y concentración de las moléculas del

suero en función de su peso molecular utilizando membranas de diferente diámetro de poro, permitió demostrar que el factor (o factores) de diferenciación glandular mamaria (FDGM) tenía un peso molecular superior a 50.000 Dalton.

Este hecho eliminaba la posibilidad de que tuviera relación con factores de crecimiento, que son polipéptidos pequeños, o con poliaminas.

Se recogieron los agregados pseudoglandulares, que se comienzan a desprender a los 6 días de cultivo; se consigue un buen desprendimiento agitando un cultivo de 7 días. Se centrifugaron suavemente a 100 x G durante 5 minutos, se desperdigaron las células por tripsinización y se sembraron en frascos con medio de crecimiento normal, produciéndose cultivos en monocapa normales.

Estas células responden a los sueros y a las fracciones con FDGM con mayor sensibilidad que las células MMT originales.

La adición de la fracción con FDGM reproducía el efecto diferenciador, produciendo 8 veces más agregados. O sea, que se trata de un proceso fenotípico que requiere presencia continua de FDGM, pero no se mantiene genéticamente en las células.

Como se dijo anteriormente, a la misma concentración de un suero determinado, la cantidad de agregados pseudoglandulares que se formaron fue unas diez veces mayor incubando el cultivo a 32° C en vez de a los 37° C habituales. El número de agregados era mayor, pero más pequeños y de desarrollo más lento. Sin embargo, cuando el cultivo se pasaba a 37° C una vez que había

comenzado el fenómeno de diferenciación a 32° C, se conservaba el mayor número de agregados pseudoglandulares, aumentando su ritmo de crecimiento.

Estos experimentos muestra que las condiciones metabólicas que reducen la proliferación celular aumentan la diferenciación y, contrariamente, en las mismas células, en condiciones de proliferación óptima, disminuyen los procesos de diferenciación. En el sistema ensayado por nosotros se trataba de un proceso reversible.

Cuando el medio de cultivo se suplementa con la fracción sérica que contiene las moléculas > 50 KDa (FDGM), se observa que estimula a las células MMT a liberar un factor celular de carácter termolábil, que promueve la diferenciación con mayor eficacia cuando las células se mantienen a 32° C que cuando se incuban a 37° C.

Resulta difícil dar una interpretación fisiológica al aumento de diferenciación celular a los 32° C.

La notable disminución de procesos de inducción de diferenciación celular mamaria por parte de los sueros de mujeres con carcinoma ductal infiltrante que manifiestan efectos tóxicos, deja tres posibilidades:

a) Que en la mayor parte de los SHu CaMa(+) no exista factor diferenciador glandular mamario.

b) Que en los sueros tóxicos existe un factor inhibidor del FDGM.

c) Que en los sueros de las enfermas con cáncer de mama

coexisten anticuerpos tóxicos y factores diferenciadores, pero que el efecto depende de la proporción relativa de ellos, así como de la cantidad de inmunocomplejos.

ch) Que la inactivación de estos sueros lleve aparejada la destrucción de factores séricos termolabiles asociados

V.B.4. INMUNIDAD CELULAR

En cuanto a la inmunidad celular, los linfocitos de ratones que han rechazado el tumor tras inoculación de células MMT fueron citotóxicos en presencia de suero autólogo nativo, no inactivado. La reacción aumentó tras la elución de inmunoglobulinas de la superficie de las células MMT por tratamiento ácido.

Es decir, que:

a) Nos encontramos en presencia de una reacción mediada por células que es complemento-dependiente y anticuerpo-dependiente, abreviada en la literatura inglesa con el acrónimo C'DADCMC (por "complement-dependent antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity").

b) El enlace de los anticuerpos a los antígenos de la membrana plasmática disminuye la eficiencia de la reacción inmunológica citomediada.

c) Esta reacción de linfotoxicidad podría estar inducida por antígenos del complejo principal de histocompatibilidad y por antígenos tumor-asociados.

V.B.5. REACCIONES HUMORALES Y CELULARES CRUZADAS ENTRE LOS CARCINOMAS MAMARIOS HUMANO Y MURINO

Según lo indicado anteriormente, hemos observado que los ratones que son inoculados con células MMT, han desarrollado tumor y lo han eliminado espontáneamente poseen linfocitos con acción citotóxica mediada por anticuerpos complemento-dependientes.

Estos anticuerpos, que son necesarios para el efecto linfotóxico, carecen por sí mismos de actividad tóxica (serotoxicidad negativa) sobre las células MMT.

Sin embargo, los anticuerpos de los animales que han rechazado el tumor pero carecen de toxicidad individual, inhiben la acción tóxica manifestada por el suero sanguíneo humano sobre las células MMT.

Evidentemente, se trata de un fenómeno cruzado, por el cual los anticuerpos no citotóxicos del ratón compiten eficazmente con los anticuerpos citotóxicos humanos por los mismos epitopos de los antígenos existentes en la membrana plasmática de las células MMT.

Los linfocitos humanos de pacientes con carcinoma mamario se unen a determinadas regiones de la membrana plasmática de las células MMT. Este fenómeno es evidente en los estudios cinefotomicrográficos de intervalos en contraste de fases. Sin embargo probablemente, no actúan como linfotóxicos porque no reconocen la región Fc de los anticuerpos del suero de ratón

que intervienen como mediadores de la reacción complemento-dependiente en el caso de los linfocitos del ratón.

Otra de las observaciones fue que sueros de pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama que no tienen acción tóxica sobre las células MMT, contienen un factor capaz de inducir un fenotipo compatible con diferenciación glandular mamaria.

Los estudios hechos en torno a todos estos problemas se discuten e interpretan a continuación y los datos se reúnen en una visión de conjunto en las figuras 61.A a 61.D, como se irá indicando.

a) Serotoxicidad (figura 61.A)._____

Los estudios de serotoxicidad revelan los hechos siguientes.

a.1) La absorción de los sueros sanguíneos humanos con células MMT, membrana plasmática de células MMT o suspensión de MMTV elimina el efecto de los sueros humanos con actividad serotóxica.

a.2) El empleo de suero humano que es tóxico en estado nativo, pierde la serotoxicidad cuando el complemento es inactivado por calentamiento a 56° C durante 30 minutos.

a.3) Es decir, que:

a.3.1) El suero sanguíneo humano es tóxico para las células MMT porque tiene anticuerpos que reaccionan cruzadamente con los antígenos murinos de las células MMT.

a.3.2) La reacción es complemento-dependiente.

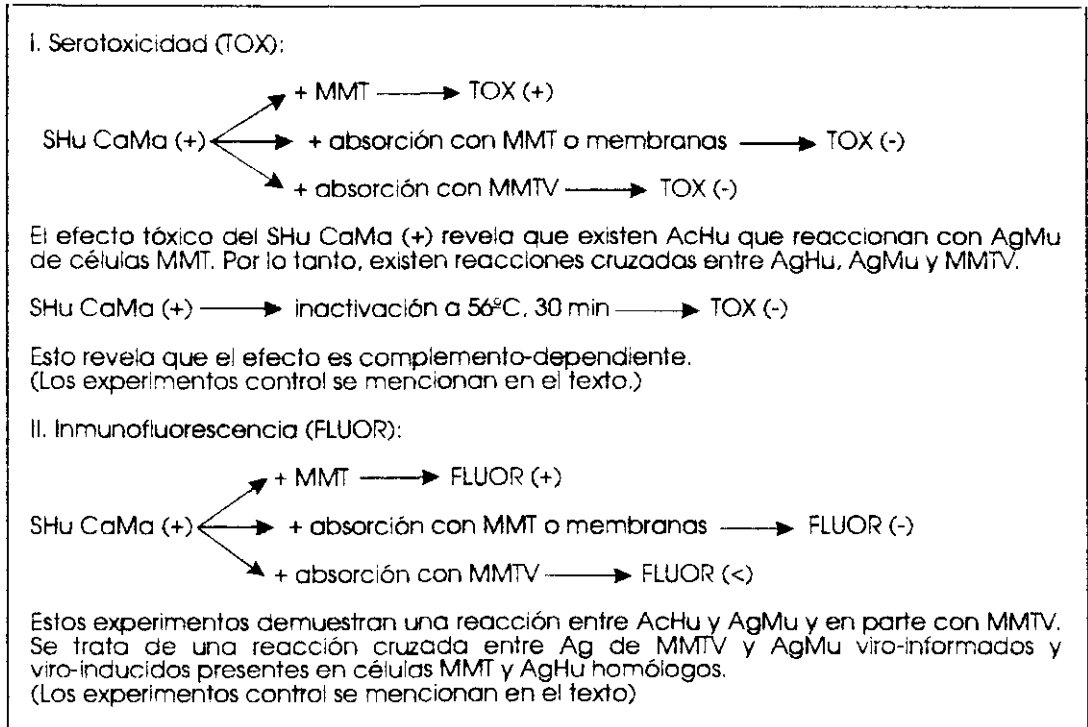
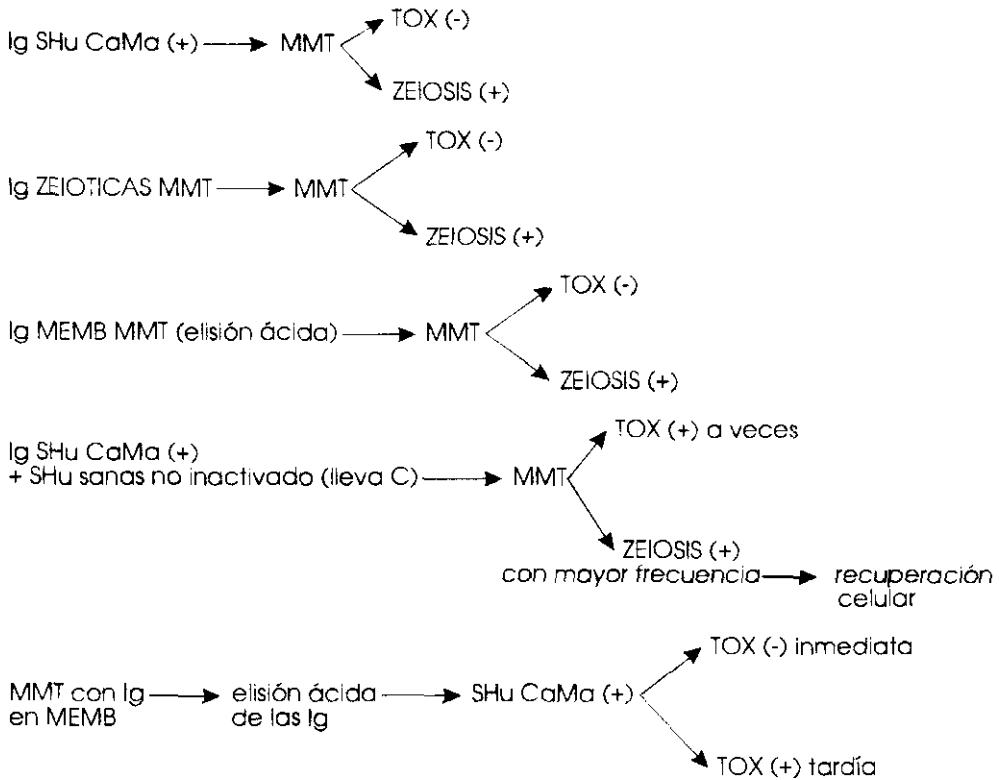


Figura 61 A

REACCIONES INMUNOLÓGICAS HUMORALES Y CELULARES CRUZADAS EN EL CARCINOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA Y MURINA (1/5)

III. Efecto de las inmunoglobulinas (Ig) purificadas:



Estos experimentos muestran que a pesar de que el SHu CaMa (+) es tóxico, las Ig purificadas a partir del mismo no son tóxicas, sino que provocan una zeiosis. Las vesículas zeioticas desprendidas contienen IC híbridos (AgMu-AcHu) y las células se acaban recuperando. Es uno de los fenómenos de inmunomodulación y uno de los mecanismos de escape de las células cancerosas. Se produce cuando los antígenos son escasos y los anticuerpos abundantes. En cambio, las vesículas zeioticas arrastran antígenos capaces de reaccionar con anticuerpos libres.

La aparición de fenómenos tóxicos cuando a las Ig SHu CaMa (+) de mujeres sanas sin inactivación térmica, se debe a la presencia de complemento, que es necesario para la acción de las Ig. El que se conserve en muchos casos la zeiosis y no aumenten los casos de toxicidad se puede deber a que el SHu CaMa (+) nativo no inactivado contenga, además de complemento, algún factor adyuvante.

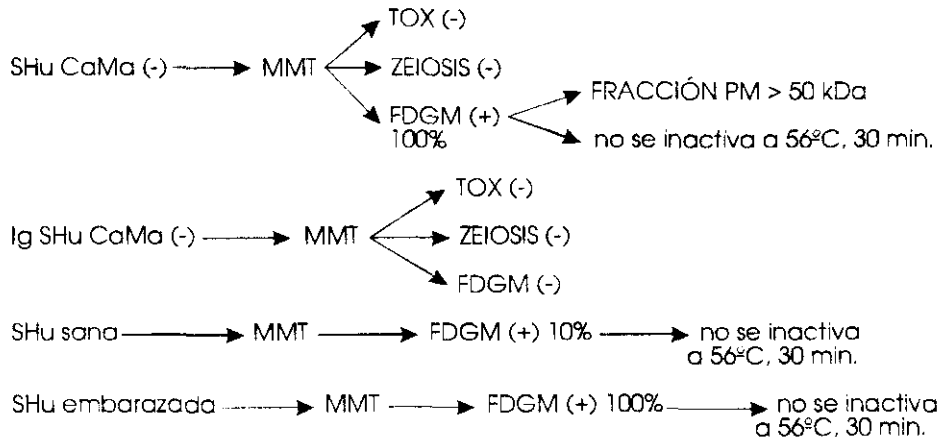
Las Ig tóxicas se pueden elidir por tratamiento ácido de las células MMT intactas, de sus membranas purificadas y de las vesículas zeioticas.

(Los experimentos control se mencionan en el texto.)

Figura 61 B

REACCIONES INMUNOLÓGICAS HUMORALES Y CELULARES CRUZADAS EN EL CARCINOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA Y MURINA (2/5)

IV. Sueros no tóxicos con efecto de diferenciación glandular mamaria:



A la luz de los resultados obtenidos se puede observar que el SHu CaMa (-) contiene un factor de diferenciación glandular mamaria (FDGM), que es una proteína > 50 kDa y con acción independiente del complemento (ya que es termoestable y persiste utilizando suero inactivado térmicamente).

El FDGM existe en el suero de todas las embarazadas y en el 10% de las mujeres sanas no embarazadas.

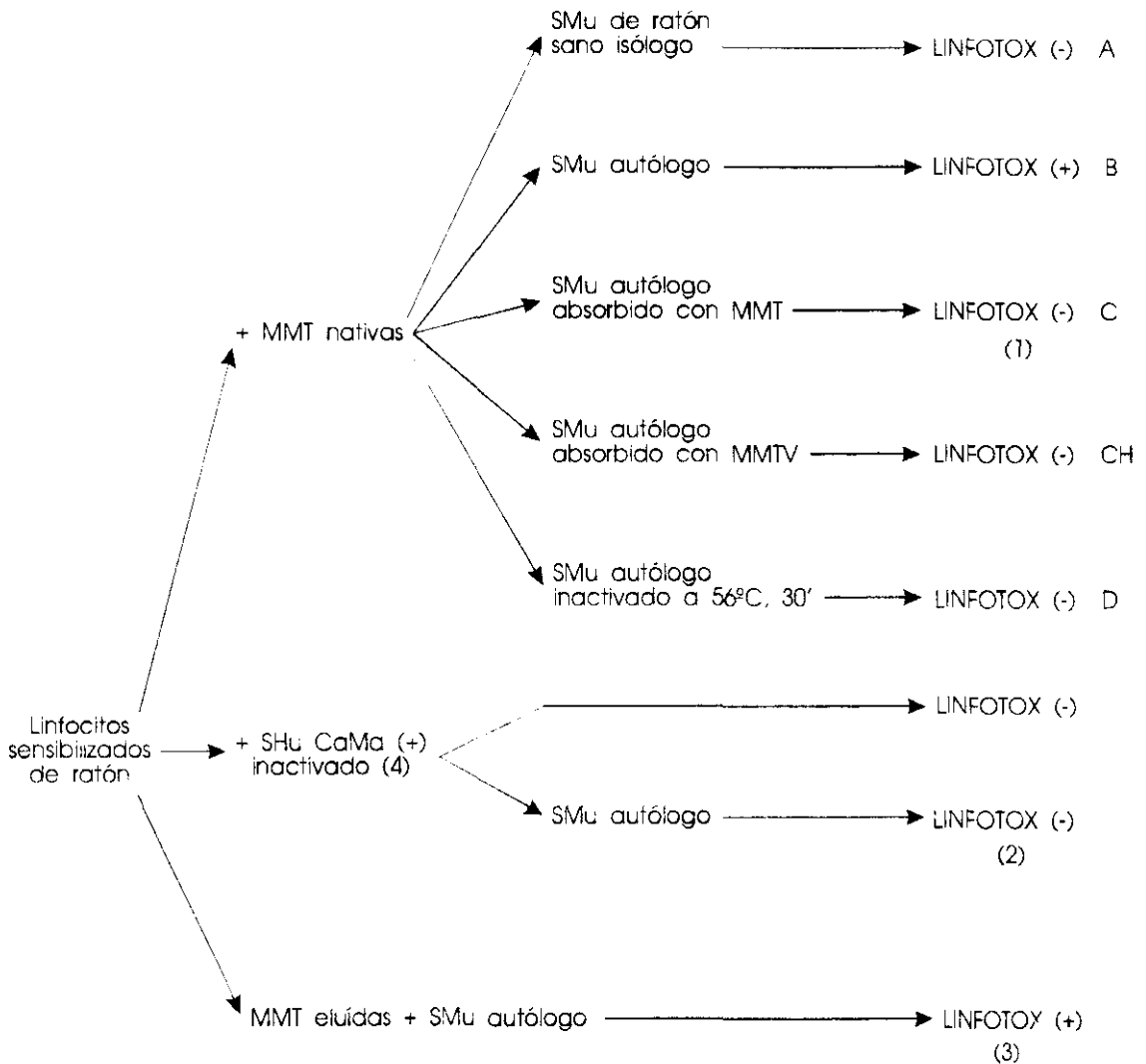
Su presencia en un grupo de enfermas de cáncer de mama revela una derrepresión extemporánea de células que tienen todavía capacidad de diferenciación. Su existencia en las embarazadas está de acuerdo con su estado, para preparar la glándula mamaria para la lactancia. Su presencia en un pequeño porcentaje de mujeres sanas no embarazadas se relaciona posiblemente con una situación hormonal particular.

(Los experimentos control se mencionan en el texto.)

Figura 61 C

REACCIONES INMUNOLÓGICAS HUMORALES Y CELULARES CRUZADAS EN EL CARCINOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA Y MURINA (3/5)

V. Toxicidad de los linfocitos de los ratones inmunizados



(1) Existe una reacción de citotoxicidad citomediada dependiente de la presencia de complemento y de Ac (C'DADCMC). La necesidad de Ac específicos se deduce de las diferencias entre el experimento A, en el que no existen Ac específicos, el experimento B, en el que existen Ac y el experimento C, en el que los Ac específicos han sido absorbidos. El experimento D muestra el carácter complemento-dependiente de la reacción.

(2) Los AcHu unidos a los AgMu impiden la actividad de los linfocitos murinos sensibilizados. Pueden estar implicados otros factores séricos.

(3) Reacción C'DADCMC muy intensa. Los IC AgMu-AcMu fijados a la membrana plasmática bloquean la efectividad de las células T citotóxicas.

(4) Para evitar el efecto tóxico, que es complemento-dependiente.

Figura 61 CH

Reacciones inmunológicas humerales y celulares cruzadas en el carcinoma de la glándula mamaria humana y murina (4/5)

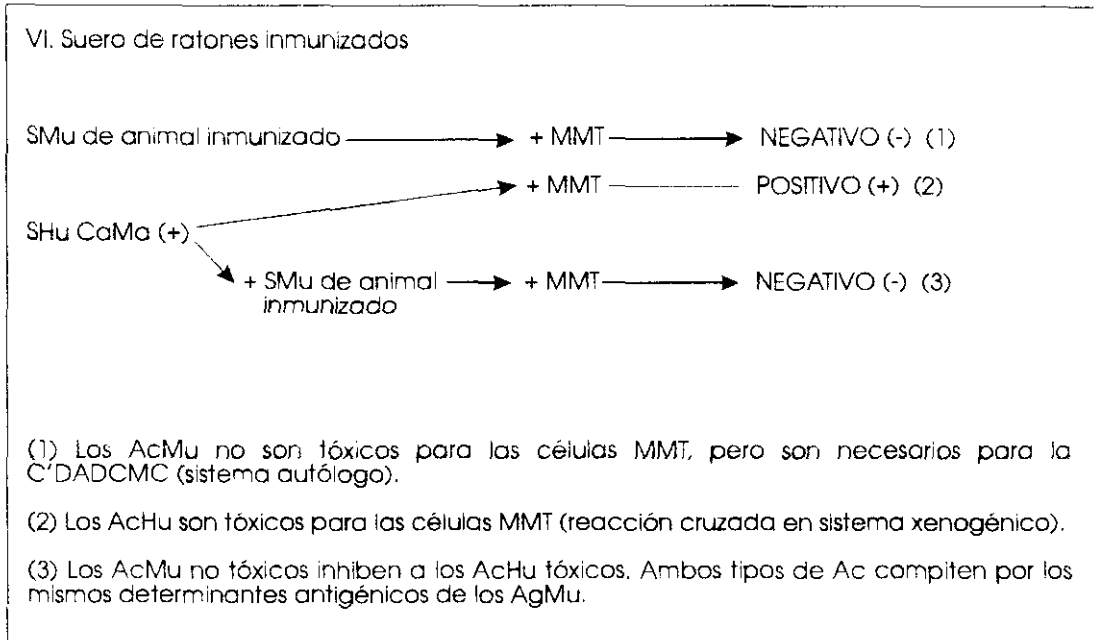


Figura 61 D

REACCIONES INMUNOLÓGICAS HUMORALES Y CELULARES CRUZADAS EN EL CARCINOMA DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA Y MURINA (5/5)

Abreviaturas de las figuras 61 A a 61 D

TOX = serotoxicidad, positiva (+) o negativa (-)
 MMT = células de adenocarcinoma murino de la línea MMT "in vitro"
 SHu = suero sanguíneo humano
 SHu CaMa = suero de enfermas con carcinoma ductal infiltrante de mama; con efectos tóxicos sobre células MMT (+), o carente de efectos tóxicos (-)
 MMTV = virus de los tumores mamarios murinos
 FLUOR = inmunofluorescencia, positiva (+) o negativa (-)
 Ag = antígenos
 AgMu = antígenos murinos
 Ig = inmunoglobulinas
 Ig SHu CaMa (+) = inmunoglobulinas del suero tóxico de enfermas con cáncer de mama
 MEMB = membrana plasmática purificada de células MMT
 C = complemento
 FDGM = factor de diferenciación glandular mamaria, presente (+) o ausente (-)
 SMu = suero sanguíneo de ratón
 LINFOTOX = linfotoxicidad, positiva (+) o negativa (-)
 Ac = anticuerpo
 IC = inmunocomplejos

a.3.3) La membrana plasmática de las células MMT y de la cubierta del MMTV tienen antígenos homólogos.

b) Inmunofluorescencia

En cuanto los estudios de inmunofluorescencia se encuentra que:

b.1.) La inmunofluorescencia del suero sanguíneo, que presenta las enfermas con cáncer de mama sobre las células MMT, desaparece cuando los sueros son absorbidos previamente con células MMT o membranas plasmáticas de las mismas.

b.2.) La inmunofluorescencia también es absorbida, y con mayor eficacia, cuando se utilizan membranas de adenocarcinoma mamario espontáneo de ratones C3H. En cambio, prácticamente no se absorbe con membranas de células normales.

b.3.) La inmunofluorescencia del suero humano disminuye sin desaparecer cuando es absorbido con MMTV purificado. Esto se puede interpretar por la existencia de una reacción cruzada entre algunos determinantes antigénicos de la membrana plasmática de las células MMT y algunos epitopos de la cubierta del MMTV

c) Inmunoglobulinas

Del estudio de las inmunoglobulinas purificadas se deducen las siguientes conclusiones:

c.1) El efecto serotóxico del suero humano tóxico no es producido por las inmunoglobulinas purificadas a partir del mismo suero tóxico. En ausencia de complemento (que contiene el suero no inactivado). En lugar de ellos se produce una activa

zeiosis, desprendiéndose fragmentos de membrana cargada, de complejos antígeno murino-anticuerpo-humano que arrastran pequeñas porciones de citoplasma. Como se mencionó en "Resultados", las células sufren cambios morfológicos más o menos aparatosos cuando se ven por cinefotomicrografía de intervalos. Al final, las células se recuperan y reinician su crecimiento normal.

Diversos estudios han demostrado que este fenómeno se observa cuando los antígenos son escasos y las inmunoglobulinas abundantes o cuando habiendo una expresión antigénica suficiente en la membrana, la reacción es incompleta, como en el caso de falta de complemento o bloqueo de epitopos. En estas condiciones, las células neoplásicas pueden recuperarse.

c.2) El suero humano normal no inactivado (por lo tanto con complemento), mezclado con inmunoglobulinas de suero humano tóxico de enfermas de carcinoma mamario es tóxico para las células MMT.

Pero las células MMT pueden evadir esta toxicidad. La cinefotomicrografía de intervalos en contraste de fases muestra que se produce zeiosis, o sea, fragmentos de membrana plasmática y citoplasma que contienen inmunocomplejos híbridos (antígeno murino-anticuerpo humano).

Experimentos de diversos autores han demostrado que uno de los procesos de inmunomodulación se debe a liberación de antígenos de membrana con liberación de TAA que se unen a los linfocitos y a los anticuerpos circulantes impidiendo que

lleguen a las células cancerosas. Este mecanismo de escape del tumor al ataque inmunológico se ha observado en el cáncer mamario ascítico TA3/Ha murino (Nowotny y col, 1974), sublínea de cáncer mamario que suelta gran cantidad de TAA solubles de la membrana plasmática, a la vez que pierde muchos antígenos del sistema H-2, por lo que se ha vuelto inmunorresistente.

Pensamos que la inmunomodulación debida a liberación de TAA solubles y formación de inmunocomplejos se produce en gran parte a nivel de la propia membrana celular, y la liberación de vesículas zeióticas que hemos registrado cinefotomicrográficamente corresponde a la expresión morfológica del fenómeno.

c.3) El efecto del suero tóxico es bloqueado añadiendo inmunoglobulinas obtenidas de vesículas zeióticas de células MMT o inmunoglobulinas elididas a pH ácido de las membranas de células MMT preincubadas con Ig de suero tóxico.

Este hecho se puede interpretar pensando que las vesículas zeióticas que han sido liberadas por el tratamiento ácido arrastran antígenos en cantidad suficiente para inhibir la acción de los anticuerpos libres que aún no hubiesen reaccionado con las células en las condiciones de nuestros experimentos.

a.4) En las células MMT sometidas a una elución ácida, para separar las inmunoglobulinas humanas unidas a los antígenos de membrana murinos, la adición de SHu CaMa(+) no produce efecto tóxico en las células si se exponen

inmediatamente después del tratamiento ácido, observándose en cambio, cuando las células se exponen 24 horas después.

c.5) Tampoco hay toxicidad en los sistemas control: combinaciones diversas sobre células de embrión de ratón normales, o en la mezcla de suero humano e inmunoglobulinas de mujeres sanas, sea sobre células normales o MMT.

ch) Diferenciación glandular mamaria (figura 61.C).

Por lo que respecta al análisis de los sueros humanos del grupo de enfermas con cáncer de mama que en lugar de efecto tóxico muestra la existencia de factores de diferenciación glandular mamaria (FDGM) se registraron los siguientes datos:

ch.1) La mezcla de suero humano normal e inmunoglobulinas de los sueros humanos del grupo de enfermas de carcinoma mamario que no producen toxicidad, SHu CaMa(-), sino efectos de diferenciación celular mamaria, nunca manifiesta fenómenos tóxicos sobre las células MMT, ni producción de zeiosis

ch.2) El suero con FDGM induce la diferenciación pseudoglandular en las células MMT. Los factores inductores de diferenciación celular mamaria son proteínas y se encuentran en la fracción de peso molecular mayor que 50.000 Da.

ch.3) El FDGM es termoestable, no siendo inactivado por el tratamiento térmico a 56° C durante 30 minutos. Como en estas condiciones se destruye el complemento, es evidente que la actividad del FDGM es independiente del mismo.

ch.4) Los sueros sanguíneos de algunas mujeres normales poseen FDGM, igualmente con acción complemento-independiente.

Aunque el efecto inductor de diferenciación celular mamaria de ciertos sueros normales llega a ser marcado, hay sueros de pacientes con carcinoma mamario con efectos diferenciadores más intensos, que provocan la formación de mayor número de agrupamientos pseudoglandulares bien desarrollados.

La producción de FDGM corresponde a la expresión de la actividad de genes relacionados con la función específica de la glándula mamaria. Su aumento en las mujeres embarazadas parece una consecuencia lógica para la preparación de la mama lactante. En las pacientes con cáncer de mama representan la derrepresión anómala en células que no han perdido totalmente la capacidad de diferenciación. En las mujeres con sueros tóxicos no se producen por la represión de los genes diferenciadores en células que tienden a la indiferenciación. En las mujeres sanas no embarazadas los genes de activación glandular mamaria están normalmente reprimidos, aunque hay una pequeña producción en algunos casos, posiblemente asociada a cambios hormonales.

d) Toxicidad de los linfocitos de los ratones inmunizados (figura 61.CH).

Examinando la citotoxicidad de los linfocitos para las células MMT se hicieron las siguientes observaciones.

d.1. Los linfocitos de ratón sensibilizados por los antígenos MMT, puestos en presencia de células MMT producen un efecto tóxico cuando los linfocitos se suspenden en suero

sanguíneo murino autólogo.

d.2) El efecto linfotóxico no se produce utilizando:

d.2.1) suero murino normal isólogo; d.2.2) suero murino autólogo absorbido con células MMT o con MMTV; o d.2.3) suero murino autólogo inactivado a 56 ° C durante 30 minutos.

d.3) Se trata por lo tanto de una reacción de citotoxicidad citomediada dependiente de la presencia de complemento y de anticuerpos, C'DADCM. La necesidad de anticuerpos específicos se deduce de la diferencia entre la producción de linfotoxicidad en presencia de suero autólogo nativo, que posee anticuerpos, y la ausencia de linfotoxicidad en presencia de suero isólogo, que carece de anticuerpos anti-MMT, así como de suero autólogo absorbido con células MMT o MMTV, en el que los anticuerpos han sido eliminados.

d.4) Los linfocitos sensibilizados de ratón suspendidos en suero sanguíneo humano tóxico inactivado procedente de enfermas con carcinoma mamario no manifiestan linfotoxicidad sobre las células MMT.

El fenómeno se puede deber a que los anticuerpos del suero humano de las pacientes con cáncer de mama que se unen a los antígenos murinos de las células MMT bloqueen la actividad de los linfocitos murinos sensibilizados, que no pueden acoplarse con eficacia a los anticuerpos humanos.

e) Suero de ratones inmunizados (figura 61.D).

Por su parte, el estudio de la toxicidad del suero de ratones inmunizados sobre las células MMT muestra que el suero

sanguíneo de ratones inmunizados no es tóxico para las células MMT. Es decir, que en el sistema inmunológico autólogo, los anticuepos anti-MMT no son tóxicos para las células MMT, aunque, como vimos, son necesarios para la C'DADCM e impiden, por otra parte, que los sueros humanos tóxicos ejerzan sus efectos cuando se añaden a células MMT cultivadas en su presencia.

Por lo tanto, también en este caso se puede pensar que existen antígenos homólogos en las células cancerosas mamarias humanas y murinas. En gran parte, se trataría de antígenos celulares viro-inducidos, en el caso de las células murinas, el resultado de la expresión de genes celulares homólogos del virus murino MMTV, en el caso de las células humanas.

V.B.6. UTILIDAD POTENCIAL DE ALGUNOS PRODUCTOS DE LAS CELULAS CANCEROSAS COMO MARCADORES TUMORALES O COMO INDICADORES DE PRONOSTICO

Existen actualmente métodos para la caracterización de secuencias de tipo vírico en las células humanas. Como se ha mencionado, estudios de diversos autores indican que puede tratarse de genes humanos homólogos de virogenes murinos que pueden transcribir virus oncogénicos de tipo ARN, como el MMTV, aunque en el caso de las células humanas no se comporten como auténticos virogenes.

No obstante, no se puede perder de vista que en algunos

casos de carcinoma mamario humano se ha encontrado transcriptasa inversa e incluso partículas víricas, que podrían proceder de la inducción, bajo ciertas condiciones, de virogenes humanos habitualmente defectivos.

Los genes humanos homólogos de los virogenes murinos pueden proceder de un origen filogenético común, que en el caso de los ratones dio lugar a un retrovirus oncogénico, no así en el caso de los genes humanos correspondientes. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que las células humanas contengan virogenes defectivos, que sólo en determinadas circunstancias pueden transcribir partículas víricas defectivas y, rara vez, partículas víricas maduras o vegetativas.

Lo cierto es que la relación de algunos antígenos humanos y murinos emparentados con los antígenos del MMTV revela que el genoma de las células cancerosas de glándula mamaria humana contiene una región de ácido desoxirribonucleico complementario del ARN del MMTV. Por experimentos realizados por otros grupos se sabe que una de las regiones complementarias es del tipo de la secuencia LTR, que es promotora de la actividad de algunos oncogenes celulares.

Existen también antígenos tumor-asociados homólogos de los carcinomas mamaros humano y murino no emparentados con los antígenos de las partículas del MMTV. Esto significa que en el carcinoma mamario humano sin virus vegetativos existen antígenos homólogos de los antígenos inducidos por el MMTV en el carcinoma mamario murino.

En el trabajo que presentamos, es de destacar el hecho de que la cantidad de anticuerpos tóxicos para las células MMT, cuando existen, la inmunofluorescencia positiva, la absorción de anticuerpos citotóxicos por el MMTV, la existencia de linfotropismo hacia las células MMT y la ausencia de inmunocomplejos parecen relacionarse favorablemente con la supervivencia de las pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama, incluso en presencia de ganglios regionales (axilares) afectados.

De hecho, la ausencia de anticuerpos anti-MMTV en mujeres con cáncer de mama y afectación ganglionar, fue de mal pronóstico en la pequeña muestra valorada en estos trabajos.

En nuestro estudio, al cabo de varios años, las únicas pacientes con carcinoma mamario y afectación ganglionar que sobreviven son las tres que tuvieron un título elevado de anticuerpos anti-MMT y anti-MMTV y linfotropismo evidente sobre las células MMT y no formaban inmunocomplejos.

En la literatura hemos encontrado algunos trabajos que tiene cierta relación con el nuestro.

Chaitnik y col. (1987) estudiaron 91 casos de cáncer de mama en estadio I, hasta 14 años después de la mastectomía: la supervivencia a los 10 años del 65 %, existiendo una ligera tendencia a mejor supervivencia, pero de escasa significación, cuando había infiltración linfocitaria perivenosa, infiltración linfocitaria tumoral difusa o histiocitosis sinusal de los ganglios linfáticos no invadidos. Tampoco hay grandes

variaciones con el tipo histológico, diferenciación nuclear, edad y raza con la situación medial o lateral. Uno de los factores de más clara significación pronóstica es la existencia tisular de un antígeno que da reacción cruzada con la glicoproteína de 52 dalton (gp52) de la cubierta del MMTV. Este antígeno no existe en todos los tumores mamarios ni tiene relación con las reacciones inmunológicas del organismo.

Herberman (1979) estudió la inmunocompetencia celular y la inmunidad mediada por células en varias pacientes con cáncer de mama, observando que algunas de las mismas presentaban una depresión de la respuesta linfoproliferativa frente a la PHA en cultivo linfocitario mixto, imputable en algunos casos a las células supresoras. Muchas pacientes con cáncer de mama presentaban una inmunidad celular frente a extractos de tumores autólogos y alogénicos, así como linfoproliferación e inhibición de la migración leucocitaria. Cierta número de mujeres presentaron reacción frente a antígenos asociados con el MMTV. Algunos de los tests inmunológicos celulares presentaron correlación con la evolución clínica y, por tanto, podrían utilizarse en el manejo de las mujeres con cáncer de mama.

Mediante la técnica de la ventana cutánea, Black y Leis (1973) mostraron la existencia de reacciones inmunológicas contra células de carcinoma mamario autólogo. Para la realización de esta técnica, se preparan finos cortes de tejido de carcinoma mamario con un criostato, se montan sobre un

cubreobjetos y se aplican sobre una zona de piel previamente erosionada ligeramente. A las treinta horas se observa al microscopio la presencia de distintos tipos celulares. El aumento de linfocitos basófilos y células mononucleares corresponde a un pronóstico más favorable (Black y Leis, 1971). La respuesta es mayor en las fases iniciales que en las avanzadas del desarrollo tumoral. La reacción positiva de la ventana cutánea va acompañada de reacción linforreticular de los ganglios axilares.

Black y col (1988) valoraron en 267 pacientes inmunidad citomediada por medio de la ventana cutánea, observando la respuesta de las células mononucleares sobre fragmentos de tejido canceroso autólogo, con seguimiento periódico durante 10 años. En el momento de iniciar el estudio, ningún caso tenía metástasis clínicas. La reactividad tiene significado pronóstico respecto a la supervivencia a 5 años, ajustando edad, histopatología y estadio.

En los carcinomas poco diferenciados, la respuesta correspondía a mayor supervivencia. En los carcinomas bien diferenciados la evolución fue favorable tanto en los casos que respondían como en los que no respondían.

La reactividad depende de un antígeno de las células cancerosas que es homólogo del antígeno gp55 del MMTV RIII y son equivalentes en la ventana cutánea a la reacción monocitaria frente a tejido canceroso autólogo y frente a antígeno RIII-gp55.

Según estos autores, el pronóstico del cáncer de mama puede hacerse en función de su grado de diferenciación nuclear y de la respuesta del organismo a tejido canceroso autólogo o a RIII-gp55 en la prueba de la ventana. Los casos que responden obtienen posiblemente mejores resultados con la inmunoterapia o los moduladores de la respuesta biológica.

Nosotros pensamos que algunos de los hallazgos realizados en este trabajo podrían tener utilidad en la clínica como indicadores pronósticos. Para ello sería necesario correlacionarlos con marcadores tumorales, como CA15,3 MCA y CEA, y con la valoración de las actividades séricas de las isoenzimas lactato deshidrogenasa (LDH), fosfohexosa isomerasa (PHI), ceruloplasmina, fosfatasa alcalina (AP) y gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT). El análisis de pacientes en diversos estadios de cáncer de mama muestra que la CA15.3 y el MCA son mucho más sensibles, que el CEA, superándolos este en especificidad. También se encuentra relación paralela entre las concentraciones de CA15.3 y MCA con el estadio y evolución tumoral. Por su parte, las actividades de las enzimas séricas LDA y PHI aumentan cuando existen metástasis pulmonares.

Con la preocupación de encontrar nuevos marcadores se están desarrollando muchos estudios. El anticuerpo monoclonal murino PR92 obtenido contra la línea celular DV145, de adenocarcinoma de próstata humana, reacciona con las células DV145, con las MCF-7, de adenocarcinoma mamario, y con las células CHAGO, de carcinoma pulmonar. No reaccionó con líneas

celulares normales ni de otras 16 líneas cancerosas. El antígeno reconocido por el AMC DV145 existe también en el suero sanguíneo del 74 % de los casos de carcinoma de próstata y del 87 % de enfermas de carcinoma mamario. El antígeno sólo se detectó en 1 % de sujetos normales y 2 % de las lesiones mamarias benignas (Kim, Robinson y Tomita, 1989). DV145 puede ser un buen marcador para diagnóstico y seguimiento de los carcinomas de próstata y mama.

Experimentos más recientes muestran que la mucina del carcinoma mamario (BCM) puede ser un marcador de los tumores mamarios pretratamiento. La BCM es uno de los antígenos asociados al cáncer de mama y ha sido definido por anticuerpo monoclonal. Se ha visto que esta glucoproteína de alto peso molecular, no específica de estos tumores, también aumenta en tumores de origen ovárico, pulmonar (adenocarcinoma), prostático y colorrectal.

Mediante un método nuevo denominado IMx, que utiliza exclusivamente el monoclonal M85, ha sido posible determinar concentraciones de BCM en líquidos biológicos. Este anticuerpo monoclonal es una IgM y se obtuvo utilizando como inmunógeno una glicoproteína aislada del líquido ascítico de un paciente con carcinoma. Tras el estudio del BCM-IMx en pacientes con patología mamaria, se ha visto que presenta un comportamiento similar al obtenido con otros antígenos definidos por otros anticuerpos monoclonales, como el CA15.3, CA549 y MCA, por lo que puede ser utilizado como seguimiento en tumores mamarios

para la detección precoz de recidivas y/o metástasis, así como para valorar la respuesta al tratamiento.

VI. CONCLUSIONES

Hemos estudiado las reacciones inmunológicas humorales y cito-mediadas del carcinoma de la glándula mamaria en el ser humano y en los ratones.

Hemos confirmado algunos datos ya conocidos y enlazado con hallazgos propios, que relacionan distintos aspectos de la inmunología del cáncer de mama, algunos de posible aplicación práctica.

1. El carcinoma ductal infiltrante de mama humano y el adenocarcinoma mamario del ratón tiene reacciones cruzadas que abogan por la presencia de antígenos tumor-asociados comunes.
2. El suero de pacientes con carcinoma de mama contiene anticuerpos anticancerosos termoestables y complemento-dependientes que provocan citólisis de las células MMT.
3. Las inmunoglobulinas purificadas que contienen los anticuerpos de los antisueros humanos, provocan marcados cambios en las células de carcinoma mamario

murino (MMT), pero no ocasionan su lisis. Además del complemento parece existir un factor activador sérico que es necesario para la acción lítica de las inmunoglobulinas antineoplásicas.

4. Los anticuerpos antineoplásicos forman inmunocomplejos circulantes e inmunocomplejos fijos a la membrana celular. Se detectaron inmunocomplejos circulantes en el suero de pacientes y de ratones con cáncer mamario y en la membrana de las células MMT. La evolución neoplásica es más rápida en presencia de inmunocomplejos bloqueantes circulantes y fijos.
5. Cuando los anticuerpos tóxicos se añaden en ausencia de complemento, en las células MMT se produce zeiosis seguida de recuperación. Como se sabe, este es uno de los mecanismos de la modulación inmunológica.
6. En las vesícula zeióticas que se liberan al medio de cultivo se detectan anticuerpos que forman inmunocomplejos heterólogos de tamaños moleculares muy diversos, por lo que pensamos que los registros cinefotomicrográficos expuestos en este trabajo representan la expresión morfológica de la formación de algunos inmunocomplejos.
7. Los anticuerpos de las mujeres con carcinoma mamario reaccionan con antígenos de las células MMT, membranas aisladas de las mismas y virus de los tumores mamarios murinos (MMTV) purificado.

8. Los ratones inmunizados con células MMT presentan en su suero anticuerpos no citotóxicos capaces de inhibir la serotoxicidad de los sueros de las enfermas.
9. Algunos antígenos humanos y murinos emparentados tienen relación con antígenos del virus del tumor mamario murino (MMTV), aunque no se observen partículas víricas en los tumores humanos. Dichos antígenos son la expresión proteica de la actividad de secuencias endógenas de ADN homólogas del ADNc del MMTV.
10. Existe una correlación directa entre cantidad de anticuerpos anti-MMT y supervivencia de las pacientes con SHu CaMa(+), incluso en presencia de afectación ganglionar.
11. Los sueros de todas las mujeres sanas embarazadas contienen un factor de diferenciación glandular mamario (FDGM) que existe también en el suero de algunas mujeres sanas y en muchas pacientes de cáncer de mama. El FDGM es termoestable y complemento independiente, con un P.M. > 50 KDa.
12. La expresión aumentada de FDGM en las pacientes no serotóxicas puede corresponder a la derrepresión en el genoma alterado de las células cancerosas de los genes implicados en la diferenciación de las glándulas.

13. La expresión disminuida de FDGM en las pacientes serotóxicas puede corresponder contrariamente a la represión de los genes implicados en la diferenciación de estas células.
14. Los resultados obtenidos en los estudios realizados a diferentes temperaturas indican que existe una correlación inversa entre proliferación y diferenciación. EL FDGM parece actuar a través de un receptor presente en la membrana, que no se expresa por igual en todas las células MMT.
15. El FDGM induce un proceso fenotípico que necesita de su presencia continua para manifestarse y para mantenerse.
16. Los linfocitos de pacientes con carcinoma de mama y de ratones inoculados con células MMT manifiestan la existencia de una reacción mediada por células que es complemento-dependiente y anticuerpo-dependiente (C'DADCMC) contra las células MMT.
17. Los linfocitos de las pacientes presentan tropismos sobre las células MMT que no se observan en las mujeres sanas.
18. Existe una buena correlación entre la presencia de estos tropismos y la supervivencia de las pacientes.
19. Con los sistemas experimentales utilizados se puede concluir que hemos encontrado datos de potencial interés como *indicadores pronósticos del carcinoma*

ductal infiltrante de la glándula mamaria en la mujer:

- 19.1. Manifestación de *serotoxicidad* del suero de las pacientes sobre células MMT. La supervivencia aumenta conforme la cantidad de *anticuerpos anti-MMT* es mayor.
- 19.2. Presencia en el suero sanguíneo de las pacientes de *anticuerpos anti-MMTV*. El aumento de la cantidad de anticuerpos anti-MMTV es proporcional a la supervivencia.
- 19.3. Existencia de *inmunocomplejos circulantes*. El aumento de la cantidad de inmunocomplejos circulantes es inversamente proporcional a la supervivencia.
- 19.4. Presencia de una *reacción C'DADCMC* contra células MMT.
- 19.5. *Linfotropismo* de los linfocitos de las enfermas hacia células MMT.
- 19.6. *Inhibición del linfotropismo* positivo por el suero sanguíneo de ratón inmunizado con células MMT.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abe M, Rufe D. Effects of maturational agents on expression and secretion of two partially characterized high molecular weight milk-related glycoprotein in MCF-7 breast carcinoma cells. J Cell Physiol 1986; 126: 126-32.
- Alford C, Hollinshead AC, Herberman RB. Delayed cutaneous hypersensitivity reactions to extracts of malignant and normal human breast cells. Ann Surg 1973; 178: 20.
- Al-Sarraf M, Wong P, Sardesai S et al. Clinical immunologic responsiveness in malignant disease. I. Delayed hypersensitivity reaction and the effect of cytotoxic drugs. Cancer 1970; 26: 262.
- Alberti O Jr, Brentani MM, Goes JC, Lemos LB, Torloni H. Carcinoembryonic antigen. A possible predictor of recurrence in cystosarcoma phyllodes. Cancer 1986; 56: 1042-5.
- Alvarez-García MC, Valladares Y, Alvarez Y. Purification of CV virus by CsCl density gradient centrifugation and extraction of viral DNA by MAK column chromatography. Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig A 1974; 229: 343-51.
- Allende MT, Roiz MC, Fueyo A, Lenneart L, Ruibal A. High BCM seric levels in patients having non breast tumours. First results. Bull Cancer 1990; 77: 1031-2.

- Andersen V, Bjerrum O, Bendixen B et al. Effect of autologous mammary tumour extracts on human leukocyte migration in vitro. Int J Cancer 1970; 5: 357.
- Anderson B, Slota J, Kundu S et al. Characterization of monoclonal antibodies to paragloboside and sialosyl-PG, and an improved chromatogram binding assay for rapid identifying antibodies to tumour antigens. J Cell Biochem (Suppl) 1987; 110: 157.
- Anderson D, Badzioch M. Risk of familial breast cancer. Cancer 1985a; 56: 383.
- Anderson D, Badzioch M. Bilateraly in familial breast cancer patients. Cancer 1985b; 56: 2092.
- Anderson DE. A high-risk group for breast carcinoma. Cancer Bull 1973; 25: 23.
- Anderson DE. The role of genetics in human breast cancer. Cancer 1974; 24: 130.
- Anderson DE. Genetics and the etiology of breast cancer. Breast 1977; 3: 37.
- Anderson DE, Haas C. Blood type A and familial breast cancer, Cancer 1984; 54: 1845-9.
- Anderson JM, Kelly F, Wood SE et al. Evaluation of leucocyte functions six years after tumour autograft in human mammary cancer. br J Cancer 1973; 28 (suppl I): 83.
- Anderson JM, Kelly F, Wood SE et al. Stimulatory immunotherapy in mammary cancer. Br J Surg 1974; 61: 778
- Andrés L de, Barneo L, Carulla J. Genetic factors in

- breast cancer. Identification of a high risk group by means of Dermatoglyphic Investigation. *Oncology* 1975; 32; 27-33.
- Andrews EJ. Failure of immunosurveillance against chemically induced in situ tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 729.
 - Anthony HM, Templeman GH, Madsen KE et al. The prognostic significance of DH skin tests in patients with carcinoma of bronchus. *Cancer* 1974; 34: 1901.
 - Aoyama A, Nagayoshi S, Malavasi-Yamashiro J et al. Genetic resistance to mammary tumorigenesis in a mouse strain with high murine mammary tumor virus expression. *Cancer Lett* 1987; 36: 119- 21.
 - Arrick BA, Korc M, Deryc K. Differential regulation of expression of three transforming growth factor β species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res* 1990; 50: 299-303.
 - Axel R, Gulati SC, Spiegelman S. Particles containing RNA instructed DNA polymerase and virus-related RNA in human breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 3133.
 - Axel R, Schlom J, Spiegelman S. Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumour virus RNA. *Nature* 1972; 235: 32.
 - Balaña C et al. Resultados a 10 años de tratamiento con Tamoxifén adyuvante en cáncer de mama operado. Comparación retrospectiva con grupo control.

- Oncología 1991; 14: 155-61.
- Balaña C, Sole LA, Rubio D, Sanz F, Salvador-Fernández L. Quimioterapia complementaria con CMF en cáncer de mama: resultados a 10 años de un estudio retrospectivo. Oncología 1990; 13 (9): 458-64.
 - Banerjee MR, Kinder DL, Wagnewr JE. Binding patterns of 3-Methylcholanthrene to replicating and nonreplicating DNA of preneoplastic nodule of mouse mammary gland. Cancer Res 1973; 33: 862-6.
 - Batchelor JR, ~~Boyse~~ EA, Gorer PA. Synergic action between isoantibody and immune cells in graft rejection. Transplant Bull 1960; 26; 449.
 - Bässler R. Patología de las enfermedades benignas de la mama. Sandorama 1985/I: 13-23.
 - Benveniste RE. The contributions of retroviruses to the study of mammalian evolution. En: Ross J MacIntre, ed. Molecular Evolutionary Genetics: Plenum Publishing Corporation, 1985; 359- 417.
 - Benvist H, Dufer J, Biakan D, Bertrand F, Desplaces A. Age related differences in immunocompetence and incidence of mammary adenocarcinoma in murine mammary tumor virus-infected C3H/Bi mice. Mech Ageing Dev 1987; 39: 21-8.
 - Berg JW, Huvos AG, Axtell M et al. A new sign of favorable prognosis in mammary cancer: hyperplastic reactive lymph nodes in the apex of the axilla. Ann Surg

1973; 177: 8.

- Bhan AK, Desmarais CH L. Immunohistologic characteritaton of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. JNCI 1983; 71: 507.
- Bhatavdekar JM, Shah NG, Balar DB et al. Plasma prolactin as an indicator of disease progression in advanced breast cancer. Cancer 1990; 65: 2028-32.
- Biancifiori C, Olivi M, Squartini F. "Degenerazione bruna" delle surrenali e cancro mammario (in vergini e "normal way bred"). Estratto da Lavori dell'Istituto di Anatomia e istologia patologica della Università degli studi di Perugia 1954; XIV (III): 233-48.
- Bieglmayer C, Szepesi T, Neunteufel W. Follow-up of metastasic breast cancer patients with a mucin-like carcinoma associated antigen: comparison to Ca 15,3 and carcinoembryonic antigen. Cancer Lett 1988; 42: 199-206.
- Bishop JM. Celular oncogenes and retrovirus. Annu Rev Biochem 1983; 53: 301.
- Black MM, Asire AJ. Palpable axillary lymph nodes in cancer of the breast: structural and biologic considerations. Cancer 1969; 23: 251.
- Black MM, Barcaly JHC, Cutler SJ et al. Association of atypical charact ristics of nenign breast lesion with subsequent risk of breast cancer. Cancer 1972; 29: 338.
- Black MM, Kwon CS, Leis HP Jr et al. Family history and

- oral contraceptives: unique relationships in breast cancer patients. Cancer 1989; 46: 2747.
- Black MM, Leis HP Jr. Cellular responses to autologous breast cancer tissue. Cancer 1971; 27: 263.
 - Black MM, Leis HP Jr. Cellular responses to autologous breast cancer tissue. Cancer 1973; 32: 384.
 - Black MM, Moore DH, Shore B et al. Effects of murine milk samples and human breast tissues on human leukocyte migration indices. Cancer Res 1974; 34: 1054.
 - Black MM, Zachrau RE, Shore B, Moore DH, Leis HP. Prognostically favorable immunogens of human breast cancer tissue: antigenic similarity to murine mammary tumor virus. Cancer 1975; 35: 121.
 - Black MM, Zachrau RE, Ashikari RH, Hankey BF. Prognostic significance of cellular immunity to autologous breast carcinoma. Forty-first Annual Cancer Symposium of the Society of Surgical Oncology and Thirty-fourth Annual Meeting of the Society of Head and Neck Surgeons, New Orleans, LA, May 22-25, 1988; 182.
 - Blair PB. Detection by immunodiffusion of mouse mammary tumor virus in milk samples and correlation with tumor development. Cancer Res 1969; 29: 745-8.
 - Blair PB. Search for cross-reacting antigenicity between mammary tumor virus-induced mammary tumors and embryonic antigens: effect of immunization on development of spontaneous mammary tumors. Cancer Res 1970; 30: 1199.

- Blot WJ. Changing patterns of breast cancer among American women. *Am J Public Health* 1980; 70: 832-5.
- Bombardieri E, Gion M, Mione R, Dittadi R, Buraggi GL. A mucinous-like carcinoma antigen (MCA) in the tissue and blood of patients with primary breast cancer. *Cancer* 1989; 63: 490-5.
- Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4332-7.
- Boyer CM, Dauson DV, Neal SE, Winchell ZF, Ring D, Bast RC Jr. Differential induction by interferons of major histocompatibility complex-encoded and non-major histocompatibility complex-encoded antigens in human breast and ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1989; 49: 2928-34.
- Boyle MDP et al. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol* 1985; 134 (1): 564-8.
- Breznik T, Cohen JC. Altered methylation of endogenous viral promoter sequences during mammary carcinogenesis. *Nature* 1982; 295: 255-7.
- Brooks WH, Netsky MG, Normansell DE et al. Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors. Characterization of a humoral immuno-suppressive factor. *J Exp Med* 1972; 136: 1631.
- Buetti E, Diggelmann H. Cloned mouse mammary tumor virus

DNA is biologically active in transfected mouse cells and its expression is stimulated by glucocorticoid hormones. Cell 1981; 23: 335-45.

- Byers VS, Levin AS, Hackett AJ et al. Tumor-specific cell-mediated immunity in household contacts of cancer patients. J Clin Invest 1975; 55: 500.
- Byrne DJ, Browninf MCK, Cuschieri A. CA7 -4: a new tumour marker for gastric cancer. Br J Surg 1990; 77: 1010-3.
- Calafat J, Hageman PC. Remarks on virus-like particles in human breast cancer. Nature 1973; 242: 260.
- Calafat J et al. Feline malignant mammary tumors. III. Presence of C-particles and intracisternal A-particles and their relationship with feline leukemia virus antigens and RD-114 virus antigens. Int J Cancer 1977; 20: 759-67.
- Calvo F, Martín PM, Jabrane N, De Cremous P, Magdelenat H. Human breast cancer cells share antigens with the myeloid monocyte lineage. Br J Cancer 1987; 56: 15-9.
- Campbell AM, McCormack MA, Ross MA, Leake RE. Immunological analysis of the specificity of the autologous humoral response in breast cancer patients. Br J Cancer 1986; 53: 7-11.
- Castellanos J, Alvarez-Rodríguez Y, del Pozo M, Valladares Y. Informe preliminar sobre una nueva técnica para la deteminación de inmunocomplejos circulantes empleando células L1210 y enzimoimmunoanálisis. Observación en

- pacientes cancerosos. Rev Esp Oncología 1985; 32: 583-93.
- Cervantes C, Moreno L, Expósito G et al. Evaluación inmunológica de la paciente con cáncer de mama. Rev Cub Cir 1979; 18: 467-72.
 - Cervantes C et al. Estudio de poblaciones linfoides en cáncer de mama. Rev Cub Med 1980; 19: 19-24.
 - Cikes M, Friberg S Jr, Klein G. Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell surface antigen(s) determined by Moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. J Natl Cancer Inst 1973; 50: 347.
 - Clark SP, Mak TW. Comparison of the sequences of the murine and gibbon ape retrovirus LTR: analysis of elements involved in transcriptional control and provirus integration. En: Progress in Cancer Research and Therapy. Gene Transfer and Cancer. ML Pearson y NL Stenberg, ed. Raven Press, New York, 1984; Vol 30: 143-56.
 - Cochran AJ, Grant RM, Spilg WG et al. Sensitization to tumour-associated antigens in human breast carcinoma. Int J Cancer 1974; 14: 19.
 - Cohen JC, Varmus HE. Endogenous mammary tumor virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. Nature 1979; 278: 418-23.
 - Cosimi AB, Brunstetter FH, Kemmerer WT et al. Cellular immune competence of breast cancer patients receiving

- radiotherapy. Arch Surg 1973; 107: 531.
- Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. Int J Cancer 1982; 30: 403-8.
 - Crepin M, Lidereau R, Chermann JC, Poillart P, Maydamena H, Montagnier L. Sequences related to mouse mammary tumor virus genome in tumor cells and lymphocytes from patients with breast cancer. Biochem Biophys Res Commun 1984; 118: 324-31.
 - Cutler SJ, Devesa SS, Bercley HC. The magnitude of the breast cancer problem. En: Arneault GS, Band P e Israël L, ed. Recent Results in Cancer Research, 1976; 57: 1-9.
 - Czajkowski NP, Rosenblatt M, Cushing FR et al. Production of active immunity to malignant neoplastic tissue: chemical coupling to an antigenic protein carrier. Cancer 1966; 19: 739.
 - Czajkowski NP, Rosenblatt M, Wolf PI et al. A new method of active immunization to autologous human tumor tissue. Lancet 1967; 2: 905.
 - Chaitchik S, Kabakow B, Dechabon A et al. Prognostic factors in breast cancer. A pathological and immunological study of patients with stage I breast cancer. Eur J Surg Oncol 1987; 13: 199-504.
 - Chan DW, Beveridge RA, Bruzaeck JD et al. Monitoring breast cancer with CA549. Clin Chem 1988; 34: 2000-4.
 - Charney J, Moore DH. Neutralization of murine mammary

- tumour virus by sera of women with breast cancer. *Nature* 1971; 229: 627.
- Darbre P, Dickson C, Peters G, Page M, Curtis S, King RJB. Androgen regulation of cell proliferation and expression of viral sequences in mouse mammary tumour cells. *Nature* 1983; 303: 431-3.
 - Darbre P, King RJ. Progression to steroid autonomy in S115 mouse mammary tumor cells: role of DNA methylation. *J Cell Biol* 1984; 99: 1410-5.
 - Darbre PD, King RJ. Differential effects of steroid hormones on parameters of cell growth. *Cancer Res* 1987; 47: 2937-44.
 - Daver A, Lennartz L, Bellia MF, Dalifard I, Lemieux P, Page M. Comparison of a new marker, BCM-EIA, to CA15.3 and MCA for detection and monitoring of breast cancer patients. *Tumor Biology* 1990; 11: 84.
 - Davis HL Jr. Management of hypercalcemia. En: BA Stoll. Breast cancer management-early and late. Willian Heinemann Medical Books Ltd, London, 1977; 185-93.
 - DeCarvalho S. Preparation of antigens specific to humab breast carcinoma by an immuno-chromatographic method. *Nature* 1964; 203: 1186.
 - Delarue JC et al. Markers in breast cancer: does CEA add to the detection by Ca 15,3?. *Breast Cancer Res and Treat* 1988; 11: 273- 276.
 - Della Porta G, Canevari S, Fossati G. Immune responses to

- tumour and embryo cells in patients with mammary carcinoma. Br J Cancer 1973; 28: 103.
- Deodhar SD, Crile G, Esselstun CB. Study of the tumor cell- interaction in patients with breast cancer. Cancer 1972; 29: 1321.
 - Díaz-Chico BN, Ogasawara Y, Chamnes GC, Salman M, McGuire WL. A 46-kDa antigen associated with estrogen receptor in human breast cancer. J Steroid Biochem 1988; 30: 315-20.
 - Dion AS, Girad AJ, Williams CC, Pomenti AA, Sedfield ES. Responses of serum from breast cancer patients to murine mammary tumor virus: factor artifact?. J Natl Cancer Inst 1987; 79: 207- 1.
 - DiPaola M, Angelini L, Bertolotti A et al. Histology of breast cancer and regional lymph nodes: Immunological significance. Int Res Commun Syst 1973; 1: 29.
 - Donehower LA, Fleurdelys B, Hager GL. Further evidence for the protein coding potential of the mammary tumor virus long terminal repeat nucleotide sequence of an endogenous proviral long terminal repeat. J Virol 1983; 45: 941-9.
 - Donegan WL. Manegement of pregnancy and lactation. En: BA Stoll. Breast cancer management-early and late. Willian Heinemann Medical Books Ltd, London, 1977; 195-202.
 - Dosne-Pasqualini C. La etiología viral del cáncer de mama. Medicina (Buenos Aires) 1980; 40: 353-9.
 - Dugan WM, Woods JR, Minnick DJ. The clinical oncology program (COP) model for cancer control: b east cancer.

- En: Alan E Liss, Inc, 150 Fifth Avenue, New York, NY 10011. *Advances in Cancer Control: Research and Development*, 1983; 347-59.
- Dux A, Demant P. MHC-controlled susceptibility to C3H-MTV-induced mouse tumors is predominantly systemic rather than local. *Int J Cancer* 1987; 40: 472-7.
 - Edwards DP, Grzyb KT, Dressler LG et al. Monoclonal antibody identification and characterization of a Mr 43,000 membrane glycoprotein associated with human breast cancer. *Cancer Res* 1986; 46: 1306-17.
 - Edwards MH, Baum M, Magarey CJ. Regression of axillary lymph nodes in cancer of the breast. *Br J Surg* 1972; 59: 776.
 - Eilber FR, Morton DL. Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer* 1970; 25:362.
 - Eilber FR, Nizze JA, Morton DL. Sequential evaluation of general immune competence in cancer patients: correlation with clinical course. *Cancer* 1975; 35: 660.
 - Enriori CL, Reforzo-Membrives J. Peripheral aromatization as a risk factor for breast and endometrial cancer in postmenopausal women: a review. *Gynecol Oncol* 1984; 17: 1-21.
 - Enriori CL, Orsini W, Cremona MC, Etkin AE, Cardillo LR, Reforzo-Membrives J. Decrease of circulating level of SHBG in postmenopausal obese women as a risk factor in breast cancer: reversible effect of weight loss. *Gynecol Oncol*

- 1986; 23: 77-86.
- Esanu V, Cajal N. Priorités mondiales méconnues de Stefan S Nicolau. Rev Roum Méd-Virol 1987; 38 (2): 147-50.
 - Eskelinen M, Tikanoja S, Collan Y. A new marker MCA in breast cancer diagnosis. Anticancer Res 1988; 8: 665-668.
 - Eskelinen M et al. Cancer associated antigen Ca 15,3 in the diagnosis of breast tumours. Scand J Clin Lab Inves 1988; 48: 653-658.
 - Estes NC, Morse PA, Humphrey LJ. Antibody studies of sera from patients with breast cancer. Surg Forum 1974; 25: 121.
 - Fanning TG, Cardiff RD. Alterations of mouse mammary tumor virus DNA during mammary tumorigenesis. En: George Klein, ed. Advances in Viral Oncology. Raven Press, New York, 1984; Vol 4: 71-94.
 - Fenyo EM, Klein E, Klein G. Selection of an immunoresistant Moloney lymphoma subline with decrease concentration of tumor-specific surface antigens. J Natl Cancer Inst 1968; 40: 69.
 - Fernández-Chacón C et al. Cáncer de mama del varón: revisión de 49 pacientes. Oncología 1990; Vol 14 (2): 68-72.
 - Fernández Llana B, Fernández Fernández M, Suárez B, Allende MT. Experiencia preliminar del BCM-IMx como marcador de los tumores mamarios pretratamiento. Rev Clín Esp 1992; Vol 190 (4): 209.

- Fidler IJ. In vitro studies of cellular-mediated immunostimulation of tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 1307.
- Fischedik O, Lux H, Römer M. Epidemiological data about breast cancer in Germany. En: Chief E Grundenann, ed. *Early Diagnosis of Breast cancer. Methods and Results.* 1978; 53-63.
- Fisher B. Some thoughts concerning the primary therapy of breast cancer. En: St-Arneault G, Band P and Israël L, ed. *Recent Results in Cancer Research. Breast Cancer: a multidisciplinary approach.* Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 1976; Vol 57: 150-63.
- Fisher B. A critical commentary on the evolution of breast cancer surgery. En: Academic Press, ed, Inc. *Clinical Trials in Cancer Medicine*, 1985; 35-54.
- Fisher B et al. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med* 1985; 312: 674-81.
- Fisher B et al. Evaluation of the worth of *Corynebacterium parvum* in conjunction with chemotherapy as adjuvant treatment for primary breast cancer. *Cancer Res* 1990; 66: 220-7.
- Fisher B, Saffer EA, Fisher ER. Studies concerning the regional lymph node in cancer. III. Response of regional lymph node cell from breast and colon cancer patients to

- PHA stimulation. Cancer 1972; 30: 1202.
- Fisher ER. Pathology of breast cancer. En: William L McGuire, ed. Breast cancer. Plenum Medical Book Company, 1977. Vol 1: 43- 123.
 - Fischer P, Golob E, Hobzner W et al. Comparative effects of tumor extracts on lymphocyte transformation in peripheral blood cultures of healthy persons and patients with breast cancer. Z Krebsforsch 1969; 72: 155.
 - Flores L, Arlen M, Enguezbal A et al. Host tumor relationship in medullary carcinoma of the breast. Surg Gynecol Obstet 1974; 139: 683.
 - Fossati G, Canerari S, Della Porta G et al. Cellular immunity to human breast carcinoma. Int J Cancer 1972; 10: 391.
 - Friedell GH, Soto EA, Kumaoka S et al. Sinus histiocytosis in British and Japanese patients with breast cancer. Lancet 1974; 2: 1228.
 - Fujino N, Haga J, Sakamoto K et al. Clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA15-3 antigen associated with human mammary carcinomas: comparison ith carcinoembryonic antigen. Jpn J Clin Oncol 1986; 16: 335-46.
 - Fung PYS, Madej M, Koganti RR, Longenecker BM. Activ Specific immunotherapy of a murine mammary adenocarcinoma using a synthetic tumor-associated glycoconjugate. Cancer Res 1990; 50: 4308-14.

- Furmanski P, Longley C, Fouchev D et al. Normal human mammary cells in cultures: evidence for oncornavirus-like particles. J Natl Cancer Inst 1974; 52: 975.
- Garas J, Besbeas S, Papamatheakis J et al. Attempt with immunotherapy to control metastatic skin nodules from breast cancer by BCG. Panminerva Med 1975; 17: 193.
- Garrioch DB, Good RA and Gatti RA. Lymphocyte response to PHA in patients with non-lymphoid tumours. Lancet 1970; 1: 618.
- Gentile JM, Flickinger JT. Isolation of a tumor-specific antigen from adenocarcinoma of the breast. Surg Gynecol Obstet 1972; 135: 69.
- Glas U, Wasserman J. Effect of radiation treatment of cell-mediated immune response in carcinoma of the breast. Acta Radiol 1974; 13; 83.
- Gorodilova VV, Silino IG, Soraeva ZM. The first experience in vaccination against metastases in patients with breast cancer. Vopr Onkol 1965; 2: 22.
- Groner B, Hynes NE. Number and location of mouse mammary tumor virus proviral DNA in mouse DNA of normal tissue and of mammary tumors. J Virol 1980; 33 (3): 1013-25.
- Gross L. Mouse mammary carcinoma. En: Gross L, ed. Oncogenic viruses. Pergamon Press, Oxford and New York, 1983; Vol 1: 262- 304.
- Grosser N, Thomason DMP. Cell-mediated antitumor immunity in breast cancer patients evaluated by antigen-induced

- leukocyte adherence inhibition in test tubes. *Cancer Res* 1975; 35: 2571.
- Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 1985; 227: 257-60.
 - Gusterson BA, Monaghan P, Makendran R, Ellis J, O'Hare MJ. Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-commom acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 343-9.
 - Hainaut P, Castellazzi M, Gonzales D et al. A congenic line of the BALB/c mouse strain with the endogenous mouse mammary tumor virus proviral gene Mtv-3: tissue-specific expression and correlation with resistance to mouse mammary tumor virus infection and tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 3754-60.
 - Han T, Takita H. Immunologic impairment in bronchogenic carcinoma: a study of lymphocyte response to phytohemagglutinin. *Cancer* 1972; 30: 616.
 - Harris JR, Hellman S, Canellos GP et Fisher B. Cáncer de mama. En: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Salvat Editores. Cáncer: principios y práctica de oncología. Barcelona. JB Lippincott Company-Filadelfia, 1988: cap 34; 1041-95.
 - Hayes DF, Noska MA, Kufe DW, Zalutsky MR. Effect of radioiodination on the binding of monoclonal antibody DF3 to breast carcinoma cells. *Intl J Rad Appl Instrum (B)* 1988; 15: 235-41.

- Hayes DF, Sekine H, Marcus D, ALper CA, Kufe DW. Genetically determinated polymorphism of the circulating human breast cancer-associated DF3 antigen. Blood 1988; 71: 436-40.
- Hayes DF, Zurawski VR Jr, Kufe DW. Comparison of circulating CA 15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. J Clin Oncol 1986; 10: 1542-50.
- Haywood GR, McKhann CF. Antigenic specificities on murine sarcoma cells. Reciprocal relationship between normal transplantation antigens (H-2) and tumor-specific immunogenicity. J Exp Med 1971; 133: 1171.
- Hellström I, Hellström KE, Sjögren HO et al. Serum factors in tumor-free patients cancelling the blocking of cell-mediated tumor immunity. Int J Cancer 1971; 8: 185.
- Hellström I, Hellström KE, Warner GA. Increase of lymphocyte-mediated tumor cell destruction by certain patient sera. Int J Cancer 1973; 12: 348.
- Henderson BE. Type B virus and human breast cancer. Cancer 1974; 34: 1386.
- Henderson BE et al. An epidemiologic study of breast cancer. J Natl Inst 1974; 53 (3): 109-14.
- Herberman RB. In vivo and in vitro assay of cellular immunity to human tumor antigens. Fed Proc 1973; 32: 160.
- Herberman RB. Assessment of cellular immune response to cancer of the breast. Institute for Clinical Science.

- Reprint from Ann Clin Lab Sci, Nov/Dec 1979; Vol 9, n° 6.
- Hollinshead AC, Jaffurs WT, Alpert L et al. Isolation and identification of soluble skin-reactive membrane antigens of malignant and normal human breast cells. Cancer Res 1974; 34: 2961.
 - Hoshino M, Dmochowski L. Electron microscope study of antigens in cells of mouse mammary tumor cell lines by peroxidase labeled antibodies in sera of mammary tumor-bearing mice and of patients with breast cancer. Cancer Res 1973; 33: 2551.
 - Hudson MJK, Humphrey LJ, Mantz FA et al. Correlation of circulating serum antibody to the histological findings in breast cancer. Am J Surg 1974; 128: 756.
 - Hughes LE, Lytton B. Antigenic properties of human tumours: delayed cutaneous hypersensitivity reactions. Br Med J 1964; 1: 209.
 - Humphrey LJ, Barker C, Bokesch C et al. Immunologic competence of regional lymph nodes in patients with mammary cancer. Ann Surg 1971; 174: 282.
 - Humphrey LJ, Estes NC, Morse PA et al. Serum antibody studies in patients with mammary disease. Cancer 1974; 34: 1516.
 - Iacobelli S, Arns E, D'Orazio A, Coletti G. Detection of antigens recognized by a novel monoclonal antibody in tissue and serum from patients with breast cancer. Cancer Res 1986; 46: 3005-10.

- Iglesias-Rodríguez J. Valoración de los marcadores CA 15,3, MCA y CEA en cáncer de mama. *Oncología* 1991; Vol 14 (3): 136-143.
- Imam A, Taylor CR. Biochemical and immunological characterizations of antigens recognised by human monoclonal antibodies. *Br J Cancer* 1989; 59: 422-8.
- Irie K, Irie RE. Immunological suppression of the recurrence of spontaneous mammary tumours in C3H/He mice. *Nature* 1971; 233:133.
- Jeejeebhoy HF. Stimulation of tumor growth by the immune response. *Int J Cancer* 1974; 13: 665.
- Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ. DNA index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990; 66: 331-40.
- Kallionemi OP, Oksa H, Aaran RK. Serum Ca 15,3 assay in the diagnosis and follow-up of breast cancer. *Br J Cancer* 1988; 58: 213-125.
- Katari RS, Fernsten PD, Schlom. Characterization of the shed form of the human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) from serous effusions of patients with different types of carcinomas. *Cancer Res* 1990; 50: 4885-90.
- Keydar I, Chou CS, Hareuveni M et al. Production and characterization of monoclonal antibodies identifying breast tumor-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1362- 6.

- Keydar J, Gilead Z, Karby S et al. Production of virus by embrionic cultures co-cultivated with breast tumor cells or infected with milk from breast cancer patients. Nature (New Biol) 1973; 241: 49.
- Khoda AH, Uede T, Yamaki T, Ibagashi Y, Sugawara H, Kikuchi K. Immunobiological and biochemical characterization of solubilized rat gliosarcoma cell tumor-associated transplanta-tion antigens. Jpn J Cancer Res (Cann) 1986; 77: 333-42.
- Kim JD, Robinson DY, Tomita JT. Monoclonal antibody PR92 with restricted specificity for tumor-associated antigen of prostate and breast carcinoma. Cancer Res 1988; 48: 4543-8.
- Kim U. On the immunogenicity of tumor cells and the pattern of metastasis. En: Garth L Nicolson and Luka Milas, ed. Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspects. Raven Press, New York, 1984.
- Kim U. Factors influencing the generation of phenotypic heterogeneity in mammary tumors. En: Enrico Mihich, ed. Biological Responses in Cancer, Vol 4. Plenum Publishing Corporation, 1985; 91-124.
- Kim U. Pathogenesis and characteristics of spontaneously metastasizing mammary carcinomas and the general principle of metastasis. J Surg Oncol 1986; 33: 151-65.
- Kim U, Baumler A, Carruthers C et al. Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary

- tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 1012.
- Kirschstein RL, Rabson AS, Peters EA. Oncogenic activity of adenovirus 12 in thymectomized BALB/c and C3H/HeN mice. Proc Soc Exp Biol Med 1964; 117: 198.
 - Klein E. Viral aetiopathogenesis of tumors. Estratto dal "Boll Ist Milanese" 1971; 50 (3): 140-51.
 - Koga M, Musgrove EA, Sutherland RL. Differential effects of phorbol ester on epidermal growth factor receptors in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. Cancer Res 1990; 50: 4849-55.
 - Krebs BP et al. Utilité du Ca 15,3 dans le cancer du sein. Cancer Comm 1987; 2: 28-37.
 - Krohn K, Holle M. Recognition with a monoclonal antibody of a cytoplasmic mammary carcinoma antigen, correlated to the estrogen receptor status. Int J Cancer 1986; 37: 43-7.
 - Kronman BS, Shapiro HM, Localio SA. Newer concepts of cancer of the colon and rectum: delayed hypersensitivity responses of patients with carcinoma of the colon and other solid tumors. Dis Colon Rectum 1972; 15: 106.
 - Kryukova IN, Ilgin KV, Mazurenko NN, Vasilevskaya LN, Zhdanov VM. Immunologic study of antigens and molecular hybridation of nucleic acid from milk of breast cancer patients. Neoplasma 1975; 22 (13): 235-41.
 - Kufe DW, Hayes D, Abe M. CA15-3 and related antigens as serum markers for monitoring breast cancer. Meeting

- abstract. Biennial International Breast Cancer Research Conference, Miami, FL, March 1-5; 1987: 14-6.
- Kufe DW, Hayes D, Abe M, Ohno T, Jundy J, Shlom J. Monoclonal antibody assays for breast cancer. *Immunol Ser* 1988; 39: 67-100.
 - Kurisu M et al. Antibody-induced antigen redistribution on murine mammary tumor cells. *Gann* 1980; 71: 530-5.
 - Kusahara M, Yamaguchi K, Nagasaki K et al. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50: 3257- 3261.
 - Ladisch S et al. Modulation of the immune reponse by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *J Clin Invest* 1984; 74: 2074-81.
 - Lasfargues EY, Kramarsky B, Sargkar NH et al. Stimulation of mammary tumor virus production in a mouse mammary tumor cell line. *Cancer Res* 1970; 30: 1109-17.
 - Liao S-K, Flahart RE, Kimbo B et al. Human tumor and normal tissue reactivity of the anti-(breast cancer) monoclonal antibody BA-Br-3 and similarity to the anti-(epithelial antigen) monoclonal antibody E29. *Cancer Immunol Immunother* 1990; 31: 65- 75.
 - Lippman ME. Growth regulation of human breast cancer. *Clinical Research* 1985: 375-82.
 - Litvinov SV, Golovkina TV. Expression of proteins immunologically related to murine mammary tumour virus (MMTV) core proteins in the cells of breast cancer continuous

- lines MCF-7, T47D, MDA-231 and cells from human milk. *Acta Virol (Praha)* 1989; 33: 137-42.
- Loven D, Rakowski E, Geier A et al. A clinical evaluation of nuclear estrogen receptors combined with cytosolic estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1990; 66: 341-6.
 - Lozzio BB, López DM, Coulson P, Lais SV. High incidence of mammary tumors in mice with inherited asplenia carrier for the nucle gene. *Cancer Res* 1979; 39: 1529-33.
 - Lundy J, Grimson R, Mishiriki Y. Elevated *ras* oncogene expression correlates with lymph node metastases in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1321.
 - Lynch HT, Albano WA, Heisek et al. Genetics, biomarkers, and control of breast cancer: a review. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1984; 13: 43-92.
 - Lynch HT, Krush AJ, Lemon HM et al. Tumor variation in families with breast cancer. *JAMA* 1972; 222: 1631.
 - Mackay WD, Edwards MH, Bulbrook RD et al. Relation between plasma-cortisol plasma-endrogen-sulphates, and immune response in women with breast cancer. *Lancet* 1971; 2: 1001.
 - Mackie EJ, Chiquet-Ehrismann R, Pearson CA, Inaguma Y, Taya K, Kawarada Y, Sakakura T. Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4621-5.
 - MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast

- cancer: A review. J Natl Cancer Inst 1973; 50: 21-42.
- Maeda S et al. Leukemi serum reactive with retrovirus-related antigen in normal human placenta. Int J Cancer 1986; 38: 309-16.
 - Mählck CG, Grankvist K, Kjellgren O, Bäckström T. Relationship between CA 125 and progesterone production in women with ovarian carcinoma. Cancer 1990; 65: 2058-63.
 - Major PP, Kovac PE, Lavallée ML, Kocalik EC. Monoclonal antibodies to antigens abnormally expressed in breast cancer. J Histochem Cytochem 1987; 35: 139-48.
 - Marín i Borràs S et al. Significación diagnóstica de la determinación en suero del antígeno tumoral TA-4 y su valor en la monitorización del efecto de la radioterapia en el carcinoma de células escamosas. Oncología 1990; Vol 13 (8): 398-403.
 - Martin DS, Hayworth PE, Fugman RA. Enhanced cures of spontaneous murine mammary tumors with surgery, combination chemotherapy and immunotherapy. Cancer Res 1970; 30: 702.
 - McCoy JL, Jerome LF, Dean JH et al. Inhibition of leukocyte migration by tumor associated antigens in soluble extracts of human breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 1974; 53: 11.
 - McCredie JA, Brown ER, Cole WH. Immunologic treatment of tumors. Proc Soc Exp Biol Med 1959; 100: 31.

- McDermott EWM, Barron ET, Smyth PPA, O'Higgins NJ. Premorphological metabolic changes in human breast carcinogenesis. *Br J Surg* 1990; 77: 1179-82.
- McGuire WL. Physiological principles underling endocrine therapy of breast cancer. En: William L McGuire, ed. Breast cancer Vol 1. Plenum Medical Book Company, 1977; 217-62.
- Medina D, Heppner G. Cell-mediated "immunostimulation" induced by mammary tumor virus-free Balb/c mammary tumors. *Nature* 1973; 242: 329.
- Mehta RG, Banerjee MR. Hormone-induced RNA synthesis, its correlation with increased DNA polymerase activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 1972; 55 (2): 182.
- Mehta RG, Banerjee MR. Pregesterone receptor(s) and possible role of prolactin for its regulation in the mammary gland. *J Cell Biol* 1974; 63: 220.
- Merlo GR, Siddiqui J, Cropp CS et al. Frequent alteration of the DF3 tumor-associated antigen gene in primary human breast carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49: 6966-71.
- Meyer HNS, Friedman e, McCrate MM, Bauer WC. Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labeling. *Cancer* 1983; 51: 1879-86.
- Meyer JS. Cell kinetics in selection and stratification of patients for adjuvant therapy of breast carcinoma. Adjuvant chemotherapy and endocrine therapy for breast cancer. *NCI Monogr* 1986; 1: 25-8.

- Meyer KK, Mackler GL, Beck WC. Increased IgA in women free of recurrence after mastectomy and radiation. Arch Sur 1973; 107: 159.
- Michalides R et al. Identification of the Mtv-2 gene responsible for the early appearance of mammary tumors in the GR mouse by nucleic acid hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75 (5): 2368-72.
- Michalides R et al. Involvement of mouse mammary tumor virus in spontaneous and hormone-induced mammary tumors in low-mammary- tumor mouse strains. J Virol 1978; 27 (3): 551-9. _____
- Miller JFAP, Grant GA, Roe FJC. Effect of thymectomy on the induction of skin tumors by 3,4 benzopyrene. Nature 1963; 199: 920.
- Minton JP, Bianco MA. Serum G2-globulins in breast carcinoma. Arch Surg 1974; 109: 238.
- Monckton RP, Moroni C. Foetal calf serum acts as an inducer of endogenous C-type virus in mouse lymphoid cells. J Gen Virol 1980; 47: 59-66.
- Moore DH, Charney J, Kramarsky B et al. Search for a human breast cancer virus. Nature 1971; 229; 611.
- Moore DH. Evidence in favor of the existence of human breast cancer virus. Cancer Res 1974; 34: 2322-9.
- Moore DH, Moore CT, Moore DH Jr. ~~Factors~~ implicated in breast cancer risk. En: Hollman KH and Verley JM, ed. New frontiers in mammary pathology, Vol 2. Plenum

- Publishing Corporation. 1983; 29-84.
- Moroni C, Schumann G. Are endogenous C-type viruses involved in the immune system?. *Nature* 1977; 269: 600-1.
 - Moulton A, LoGerfo P, Suciú-Foca N et al. Lymphocyte inhibition by mammary tumor virus in patients with breast cancer. *J Surg Res* 1974; 16: 592.
 - Mukherjee AS, Woods BG, Banerjee MR. Reverse transcriptase in muMTV-free mammary tumors and differentiating normal mammary glands of BALB/c mice. *Genetics* 1973; 74 (suppl 2): 5187.
 - Müller M, Hageman PC, Daams JH. An antigen in human breast cancer sera related to the murine mammary tumor virus. *Nature (New Biol)* 1972; 237: 116.
 - Müller M, Kemmer C, Zotter S et al. Cross-reaction between human breast cancer and mastopathy and murine mammary carcinoma: localization of the antigen in type A particle virus. *Arch Geschwulstforsch* 1973; 41: 100.
 - Muller M, Kemmer C, Zotter S et al. Cross-reaction between human breast cancer and mastopathy and murine mammary carcinoma. Localization of the antigen in type A particle virus. *Arch Geschwulstforsch* 1973; 40: 285.
 - Mullick A, Chambon P. Characterization of the estrogen receptor in two antiestrogen-resistant cell lines, LY2 and T47D. *Cancer Res* 1990; 50: 333-8.
 - Murray G. Experiments in immunity in cancer. *J Can Med Assoc* 1958; 79: 249.

- Nair BK, Deome KB. A growth-stimulating factor released by cultured mouse mammary tumor cells. Cancer Res 1973; 33: 2754.
- Nalick RH, Disaia PJ, Rea T et al. Immunologic response in gynecologic malignancy as demonstrated by the delayed hypersensitivity reaction: clinical correlation. Am J Obstet Gynecol 1974; 118: 393.
- Nemoto T, Han T, Minowada J et al. Cell-mediated immune status of breast cancer patients: evaluation by skin test, lymphocyte stimulation and counts of rosette-forming cells. J Natl Cancer Inst 1974; 53: 641.
- Nemoto T, Rosner D, Dao TL. Nonspecific immunotherapy of metastatic breast cancer with BCG in conjunction with adrenalectomy or chemotherapy. Breast 1976; 2: 14.
- Newgard KW, Cardiff RD, Blair PB. Human antibodies binding to the mouse mammary tumor virus: a nonspecific reaction?. Cancer Res 1976; 36: 765.
- Nomura Y et al. Possible retention of the estrogen-binding capacity after endocrine ablation therapy in the rat and human breast cancer. Gann 1976; 67: 101-4.
- Nomura Y et al. Significance of estrogen receptor assay in cytotoxic chemotherapy in relation to previous endocrine therapy of advanced breast cancer patients. Gann 1979; 70: 473-82.
- Nossal GJV. Triumphs and trials of immunology in the

- 1980s. Life Science. Job Trends 1988; 2 (16): 1-13.
- Nowotny A, Groshman J, Abdelnoor A et al. Escape of ta3 tumors from allogenic immune rejection: theory and experiments. Eur J Immunol 1974; 4: 73.
 - Odili JL, Taylor G. Transcience of immune responses to tumour antigens in man. Br Med J 1971; 4: 584.
 - Oettgen HF, Old LJ, Farrow JH et al. Effects of dialyzable transfer factor in patients with breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 2319.
 - Ogawa H, Tanaka H. Occurrence of antibody against intracytoplasmic A-particles of mouse mammary tumor virus in sera from breast cancer patients. Gann 1978; 69: 539-44.
 - Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormone in human breast cancer cell line T47D. J Virol 1987; 61: 2059-62.
 - Osborne CK. Heterogeneity in hormone receptor status in primary and metastatic breast cancer. Seminars in Oncology 1985; 12 (3): 317-26.
 - Ouchi N, Thor A, Schlom J. Expression of the 21.0 0 molecular weight ras protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. Cancer Res 1986; 46: 2511.
 - Pancino GF, LeDoussal V, Mostada MH et al. Characterization and distribution in normal and tumoral

- human tissues of breast cancer-associated antigen defined by monoclonal antibody 7B10. *Cancer Res* 1989; 49: 7078-85.
- Papatestas AE, Kark AE. Peripheral lymphocyte counts in breast carcinoma. *Cancer* 1974; 34: 2014.
 - Pastor MC, Planells P, Carrera T, Rosel P, Bonnin R, Navarro MA. Receptores de estrógenos en el cáncer de mama. *Biométrica* 1980; 3: 97-102.
 - Paul RD et al. Splenic alterations during mammary tumorigenesis: diverse effects on different immune parameters. *Anticancer Res* 1981; 1: 63-9.
 - Perlin E, McCoy JL, Dean JH et al. Tumor-associated antigen in female and male breast cancer. *N Eng J Med* 1975; 292: 45.
 - Pons-Anicet DMF et al. Value of Ca 15,3 in the follow-up breast cancer patients. *Br J Cancer* 1987; 55: 567-569.
 - Pons-Anicet DMF et al. Ca 15,3: A prognostic factor for metastatic breast cancer. *J Tumor Marker Oncol* 1988; 3: 9-13.
 - Porro-Novo N. Nódulo de mama. Estudio estadístico de 540 casos. *Rev Cub Cir* 1986; 25: 253-7.
 - Poskitt KF, Poskitt TR. A quantitative enzyme-linked immunoassay for serum immune complexes. *J Clin Lab Immunol* 1981; 5: 125-8.
 - Prehn R. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* 1972; 176: 170.

- Prehn RT. Immunological surveillance: pro and con. En: Bach FH and Good RA, ed. Clinical Immunobiology. Academic Press, Inc, New York, 1974.
- Primack A, Vogel CL, Barker I. Immunological studies in ugandan patients with hepatocellular carcinoma. Br Med J 1973; 1; 16.
- Priori ES, Anderson DE, Williams WC et al. Immunological studies on human breast carcinoma and mouse mammary tumors. J Natl Cancer Inst 1972; 48: 1131.
- Rabadán J, Martín-Mateo MC, Bustamante J. Análisis comparativo entre ciertos metales y los marcadores tumorales en el cáncer de pulmón y de colon. Oncología 1990; 13 (9): 450-7.
- Ramírez N, Papamíja A, Emilia C, Gil R. Factores de riesgo asociados con cáncer de mama. Rev Cub Hig Epid 1978; 16: 243-55.
- Richter A, Kaspersky CL. Surface immunoglobulin positive lymphocytes in human breast cancer tissue and homolateral axillary lymph nodes. Cancer 1975; 35: 129.
- Rigley PG. Prolongation of survival of tumor-bearing animals by transfer of "immune" RNA with DEAE dextran. Nature 1969; 221: 968.
- Ringold GM. Acción de las hormonas esteroideas sobre la regulación de los virus de tumores mamarios murinos. BBA 1979; 560 (4): 397-536.
- Roberts MM. Lymphocyte transformation in breast cancer. Br

- J Surg 1971; 57: 38.
- Roberts MM, Bass EM, Wallace IWJ et al. Local immunoglobulins in breast carcinoma. Arch Surg 1974; 109: 238.
 - Roberts M, Williams WJ. Delayed hypersensibility in breast cancer. Br J Surg 1968; 55: 869.
 - Romero J et al. Antígenos de histocompatibilidad y proteína oncogénica P21 en tumores de mama. Oncología 1991; 14: 148-54.
 - Rosner D, Lane WW. Node-negative minimal invasive breast cancer patients are not candidates for routine systmic adjuvant therapy. Cancer 1990; 66: 199-205.
 - Rowinska ZE, Lazar P, Burtin P. Dosage les immunoglobulines dans le serum des cancéreus. Ann Inst Pasteur 1970; 119: 621.
 - Ruibal A, Colomer R, Genolla J. Prognostic value of Ca 15,3 serum levels in patients having breast cancer. Horm And Met 1987; 1: 11-15.
 - Safi F et al. Ca 15,3 and Breast Cancer. J Tumor Marker Oncol 1987; 2: 46-52.
 - Sakakura T, Nishizuka Y. Effect of thimectomy on mammary tumorigenesis, noduligenesis and mammogenesis in the mouse. Gann 1967; 58: 441.
 - Samuel J et al. Analysis of human tumor associated Thomsen- Friedenreich antigen. Cancer Res 1990; 50: 4801-8.

- Sanford B. Effect of neuraminidase on tumor development and growth. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 1393.
- Sanford BH. An alteration in tumor transplantability induced by neuraminidase. *Transplantation* 1967; 5: 1273.
- Sarkar NH, Charney J, Dion AS et al. Effect of human milk on the mouse mammary tumor virus. *Cancer Res* 1973; 33: 626.
- Sato S, Fukuzawa M, Nakajima H et al. The mechanism of tolerance induction of tumor-specific delayed-type hypersensitivity responses by intravenous inoculation of tumor cell. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1985; 76: 1099-106.
- Satya-Prakash KL, Pathak S, Hsu TC, Olivé M, Cailleau R. Cytogenetic on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1981; 3: 61-73.
- Sauter C, Bächli T, Lindenmann J. Human mammary carcinoma cell line: infection by an avian myxovirus as a prerequisite for immunopotentialization. *Eur J Cancer* 1975; 11: 59.
- Savel H. Effect of autologous tumor extracts on cultured human peripheral blood lymphocytes. *Cancer* 1969; 24: 56.
- Schiu RPC. Prolactin, pituitary hormones, and breast cancer. En: *Banbury Report 8. Hormones and Breast Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981; 185-96.
- Schmidt-Rhode P et al. Ca 15,3 as a tumor marker in breast cancer. *The Intern J Biol. Markers* 1987; 2: 135-142.

- Seman G, Myers B, Williams WC et al. Studies on the relationship of viruses to the origin human breast cancer. II. Virus-like particles in human breast tumors. *Tex Rep Biol Med* 1969; 27: 839.
- Seno S. Ionized groups on the cell surface: their cytochemical detection and related cell function. *Int Rev Cytol* 1987; 100: 203-48.
- Shearer WT, Philpott GW, Parker CW. Stimulation of cells by antibody. *Science* 1973; 182: 1357.
- Sherwin RP, Richters A. Pathobiologic nature of lymphocyte interaction with human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 1111.
- Shoenfeld J, Hizi A, Tal Rion and related cell function. *Int Rev Cytol* 1987; 100: 203-48.
- Shearer WT, Philpott GW, Parker CW. Stimulation of cells by antibody. *Science* 1973; 182: 1357.
- Sherwin RP, Richters A. Pathobiologic nature of lymphocyte interaction with human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 1111.
- Shoenfeld J, Hizi A, Tal R et al. Human monoclonal antibodies derived from lymph nodes of a patient with breast carcinoma react with MuMTV polypeptides. *Cancer* 1987; 59: 43-50.
- Shyamala G, Dickson C. Relationship between receptor and mammary tumour virus production after stimulation by glucocorticoid. *Nature* 1976; 262: 107-112.

- Silverberg SG, Chitale AR, Hind AD et al. Sinus histiocytosis and mammary carcinomas: study of 366 radical mastectomies and an historical review. Cancer 1970; 26: 1177.
- Silvestrini R et al. Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer. Cancer 1985; 56: 1982-7.
- Sjögren HO, Hellström I, Bansal SC et al. Elution of "blocking factors" from human tumors, capable of abrogating tumor cell- destruction by specifically immune lymphocytes. Int J Cancer 1972; 9: 274.
- Solowey AC, Rapaport FT. Immunologic responses in cancer patients. Surg Gynecol Obstet 1965; 121: 756.
- Squartini F, Bistocchi M, Sarnelli R, Basolo S. Early pathologic changes in experimental and human breast cancer: facts and comments. Part V. Hormone-pathology relationships of breast disease. Ann New York Acad Sci 1985; 231-61.
- Stegner HE. Patología de las enfermedades malignas de la mama. En: Strömbeck JO y Rosato FE. Salvat Editores SA. Cirugía de la mama: diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la mama; cap 8. Barcelona. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Thieme Inc, New York, 1990; 68-101.
- Stewart THM, Orizaga M. The presence of delayed hypersensibility toward cellular extracts of their malignant tumors. The frequency and cross-reactivity of this phenomenon in patients with breast survival. Cancer

- 1971; 28: 1472.
- Stjernswärd J, Jondal M, Vánky F et al. Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by radiation for mammary carcinoma. Lancet 1972; 1: 1352.
 - Story MT, Pattillo RA, Ruckerk ACF et al. On the isolation and characterization of soluble antigens from human breast tumor cell. In Vitro 1974; 10: 388.
 - Stromberg K, Benveniste R. Efficient isolation of endogenous rhesus retrovirus from trophoblast. Virology 1983; 128: 518-23.
 - Sumner DS, Edwards MH, Baum M. Depression of delayed hypersensibility and abnormal bone scans in early cancer of the breast. Br J Surg 1972; 59: 897.
 - Tandon AK, Clark GM, Chamnes GC, McGuire WL. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. Cancer Res 1990; 50: 3317-21.
 - Tannenbaum A, Silverstone H. Effect of limited food intake on survival of mice bearing spontaneous mammary carcinoma and on the incidence of lung metastase. Cancer Res 1953; 13: 532-6.
 - Tavassoli FA, Norris HJ. A comparasion of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. Cancer 1990; 65: 518-29.

- Ting CC, Herberman RB. Inverse relationship of polyoma tumour specific cell surface antigen to H-2 histocompatibility antigens. *Nature* 1971; 233: 118.
- Toi M, Nakamura T, Mukaida H et al. Relationship between epidermal growth factor receptor status and various prognostic factors in human breast cancer. *Cancer* 1990; 64: 1980-4.
- Tonelli QJ et al. Lack of induction of murine mammary tumor virus expression in cultured mammary glands treated with chemical carcinogenesis. *Int J Cancer* 1981; 27: 811-7.
- Tsakvakiides E, Smith C, Kersey JH et al. Transplantation antigens (H-2) on virally and chemically transformed Balb/3T3 fibroblasts in culture. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 1499.
- Tsubura Y. paternal transmission of mammary tumor virus from DD/Tbr strain of mice by crossing with BALB/c or C57BL/6J strains. *Gann* 1977; 68: 257-66.
- Tsubura Y et al. Strain difference in the expression of mammary tumor virus antigen in the male genital organs of mice during aging. *Gann* 1981; 72: 424-9.
- Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erb-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* 1990; 65: 1794-1800.
- Tubiana M, Chaubel P, Renaud A, Malaise EP. Vitesse de

- crissance et histoire naturelle du cancer du sein. Bull du Cancer 1975; 62 (4): 311-58.
- Vaage J. Humoral and cellular immune factors in the systemic control of artificially induced metastases in C3Hf mice. Cancer Res 1973; 33: 1957.
 - Vaidya AB, Black MM, Dion AS et al. Homology between human breast tumour RNA and mouse mammary tumour virus genome. Nature 1974; 249: 565.
 - Valladares Y. Forms of the cancerigenic virus genome. Nature 1974; 249: 565.
 - Valladares Y. Forms of the cancerigenic principle, cell clones, and Koch's postulates. Med pharmacol Exp 1967; 16: 462-80.
 - Valladares Y. Histogénesis y oncogenes del cáncer mamario. Anales de la Real Academia de Medicina, tomo CV, cuaderno primero, febrero de 1988.
 - Viladiú P, Bosch FJ, Benito E, Alonso MC. Utilización del antiestrógeno ICI46,474 (Tamoxifén) en el carcinoma avanzado de mama. Resultados previos. Anales del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo 1975; 6: 452-6.
 - Weiss DW, Lavrin DH, Dezfulian M, Vaage J, Brair PB. Studies on the immunology of spontaneous mammary carcinomas of mice. UICC Monograph Series 1966; 2 (19): 210-31.
 - Westley B, May F. Cloning, structure and expression of human sequences related to the mouse mammary tumour

- virus. Biennial Internat Breast-Cancer Res Fund, 1985, p 168 (meeting abstract).
- Whitaker MG, Rees K, Clark CG. Reduced lymphocyte transformation in breast carcinoma. Lancet 1971; 1: 892.
 - Williams WR, Badzioch MD, Anderson DE. Epidemiology of male breast cancer. En: Ames FC, Blumenschein GR y montagne ED, ed. Current Controversies in Breast Cancer, 1984; 589-601.
 - Williams AF et al. Cell surface glycoproteins and the origins of immunity. En: Academic Press, ed. Gene expression during normal and malignant differentiation. Inc. (London) Ltd 1985; ; 125-38.
 - Wolberg WH. Inhibition of migration of human autogenous and allogeneic leukocytes by extrats of patients cancers. Cancer Res 1971; 31: 798.
 - Wood SE, Campbell JB, Anderson JM et al. Lymphocyte response after radiotherapy. Lancet 1974; 2: 863.
 - Woodruff MFA, Boaks JL. Inhibitory effect of pre-immunized CBA splen cells on implants of A-strain mouse mammary carcinoma (CBA x A) F1 hybrid recipients. Br J Cancer 1965; 19: 411.
 - Woodruff MFA, Symes MO. The use of immunologically competent cells in the treatment of cancer: experiments with a transplantable mouse tumor. Br J Cancer 1962; 16: 707.
 - Yang J, Enami J, Nandi S. Regulation of mammary tumor

virus production by prolactin in BALB/cfC3H mouse normal mammary epithelial cells in vitro. Cancer Res 1977; 37: 3644-7.

- Yeh J, Ahmed M, Mayyasi SA et al. Detection of a ntigen related to Mason-Pfizer virus in malignant human breast tumors. Science 19 5; 190:583.
- Yohn DS, Funk CA, Kalnins VI et al. Sex related resistance in hamsters to aden virus 12 oncogenesis. Influence of thymectomy at three weeks of age. J Natl Cance Inst 1965; 35: 617.
- Yu YH, Crews JR, Cooper K et al. Use of immunotoxine in combination to inhibit clonogenic growth of human breast carcinoma cells. Cancer Res 1990; 50: 3231-8.
- Yunis EJ, Martínez C, Smith J et al. Spontaneous mammary adenocarcinoma in mice; influence of thimectomy and reconstitution with thymus grafts or spleen cells. Cancer Res 1969; 29: 174.
- Zangerle PF et al. Radioimmunoassay for glycoprotein gp47 of murine mammary tumor virus in organs and serum of mice and search for related antigens in human sera. Cancer Res 1977; 37: 4326-31.

*ESTUDIO DE ALGUNOS FENOMENOS XENOGENICOS ENTRE CANCER
MAMARIO HUMANO Y MURINO*

Tesis doctoral que presenta Herminia Valladares Alvarez

FE DE ERRATAS ADVERTIDAS

1. Página 189, figura 18. En el eje de las ordenadas, donde dice "mg/ml", debe decir "ug/ml". En el pie de la figura, donde dice "células de adenocarcinoma mamario murino CH3/He...", debe poner "células MMT..."

2. En la tabla VI, página 190, hay algunos errores de transcripción de los valores de la DI_{50} en ug/ml. Para las células de cáncer mamario murino C3H/He debe ser 22 en vez de 4 y para las células cáncer mamario murino MMT debe ser 4 en lugar de 22. Por su parte, el valor para el virus del tumor mamario (MMTV), debe ser 6 y no 600. Se adjunta la tabla corregida.

3. En las "Conclusiones", página 297, párrafo 16, donde dice "Los linfocitos de pacientes con carcinoma de mama y de ratones inoculados con células MMT...", debe decir "Los linfocitos de ratones inoculados con células MMT...", ya que los linfocitos humanos no manifiestan una reacción C'DADCMC anti-MMT, como se indica en el texto. Por la misma razón se debe suprimir el punto 19.4 de la página 298.

4. La misma errata de transliteración de datos aparece en el resumen que se adjuntó en hoja aparte. Se acompaña esta fe de erratas con el resumen corregido.